

Aus dem Institut für Pharmakologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas Worzfeld)

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Intraperitoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms:
Funktionelle Analyse der Tumor-Mesothel-Interaktion in einem
neu etablierten dreidimensionalen Invasionsassay**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simon Schwarz
aus Lörrach
Marburg (Lahn), 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 14.06.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Thomas Worzfeld

1. Korreferent: Prof. Dr. Matthias Meyer-Wittkopf

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Epidemiologie	9
1.2 Aktuelle Therapieempfehlung	10
1.3 Prozess der Metastasierung	11
1.3.1 Klassifikation und Metastasierung	11
1.3.2 Primärtumor und maligner Aszites	13
1.3.3 Mesothelzellen und Tumorzelladhäsion	15
1.3.4 Tumorzellinvasion	19
1.3.4.1 Molekulare Mechanismen	19
1.3.4.1 LPA und LPAR	22
1.3.4.2 Mikromilieu der Tumorzellen	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 OCMI-Medium und Inhaltsstoffe	27
2.1.2 Chemikalien	28
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4 Testsubstanzen	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Gewinnung der Tumor- und Mesothelzellen	30
2.2.2 Zellkultur	31
2.2.3 Vorbereitung des Adhäsions- und Invasionsassays	32
2.2.4 Durchführung der Assays	34
2.2.5 FITC-Dextran-Assay	36
2.2.6 DAPI- / ZO-1-Immunfluoreszenzfärbung	37
2.2.7 Gewinnung des konditionierten Mediums der Mesothelzellen	37
2.3 Angewandte Statistik	38
3. Ziel der Arbeit	39
4. Ergebnisse	40
4.1 Etablierung des neuartigen dreidimensionalen Invasionsassays	40
4.1.1 Epithelschicht mit mechanischer und funktioneller Barrierefunktion	42
4.1.2 Validierung der Messergebnisse	43

4.1.2.1 Quantifizierte Zellen sind Tumorzellen und submesothelial invadiert.....	44
4.1.2.2 Evidenz für Chemoattraktantien ist reproduzierbar	46
4.2 Pro-invasiver Einfluss des Mesothels.....	48
4.2.1 Mesothel sezerniert pro-migratorische Faktoren.....	49
4.2.2 Gesteigerte Migration ist konzentrationsabhängig und patientenunabhängig	50
4.3 LPA.....	53
4.3.1 LPA steigern die Tumorzelladhäsion	54
4.3.2 LPA reduzieren die Invasivität.....	55
5. Diskussion.....	56
5.1 Der neuartige 3D-Invasionsassay	56
5.1.1 Stärken und Schwächen im Vergleich	56
5.1.2 Potentielle zukünftige Anwendungsgebiete	59
5.2 Pro-invasiver Einfluss des Mesothels.....	60
5.2.1 Gesteigerte Invasivität statt Barrierefunktion	60
5.2.2 Lösliche Faktoren hauptsächlich für gesteigerte Invasivität	60
5.2.3 LPA als Mediator in der Tumormikroumgebung.....	61
5.3 Ausblick	63
6.1 Zusammenfassung.....	64
6.2 Summary	65
7. Literaturverzeichnis.....	66
8. Anhang	83
8.1 Lebenslauf.....	83
8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer /-innen	85
8.3 Danksagung	87
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung	88

Abkürzungsverzeichnis

B	Beide Kompartimente
CM.....	HPMC-konditioniertes Medium
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
EMT	epithelial-mesenchymale Transformation
EtOH.....	Ethanol
FCS	Fetal Cow Serum
HGSOC	hochgradig entdifferenziertes seröses Ovarialkarzinom
HPMC.....	humane primäre Mesothelzellen
LPA.....	Lysophosphatidsäure
LPAR.....	Lysophosphatidsäure-Rezeptor
OCC	Ovarialkarzinomzellen
OCMI-Medium	Ovarian Carcinoma Modified Ince Medium
OK	Oberes Kompartiment
PBS	Phosphate buffered saline
TME.....	Tumormikroumgebung
Trypsin-EDTA.....	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
UK	Unteres Kompartiment

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1. Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms in Deutschland (1999-2016)	9
Abb. 2. Zellschichten des Peritoneums	15
Abb. 3. Grundlegende Mechanismen der peritonealen Metastasierung der OCC	17
Abb. 4. Mesotheliale Clearance mittels Talin- und Aktinomyosin	20
Abb. 5. Molekulare Struktur der LPA	22
Abb. 6. Biosynthese der LPA in malignem Aszites an HGSOC erkrankter Patientinnen	23
Abb. 7. Übersicht der Hauptsignalwege der LPAR	24
Abb. 8. Funktion verschiedener extrazellulärer Mikrovesikel in malignem Aszites	26
Abb. 9. Schematische Darstellung der Zell-Markierung	33
Abb. 10. Schematische Darstellung des Adhäsions-Assays	34
Abb. 11. Schematische Darstellung des Migrations- / Invasionsassays	35
Abb. 12. Schematische Darstellung von Beendigung & Quantifizierung	36
Abb. 13. Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht vs. Kollagen-I	40
Abb. 14. Adhäsion der OCC an kontinuierlicher HPMC-Schicht im Zeitverlauf	41
Abb. 15. Immunhistochemisches Staining und Fluoreszenzmikroskopie	42
Abb. 16. Funktionelle Barrierefunktion der HPMC-Schicht	43
Abb. 17. Quantifizierung sichtbarer Zellen im Fluoreszenzmikroskop	44
Abb. 18. Membran der Invasions-Wells und markierte OCC	45
Abb. 19. Schematischer Aufbau des Migrations- und Invasionsassays	46
Abb. 20. Aszites und FCS als Chemoattraktantien im Migrations- und Invasionsassay	47
Abb. 21. Migration und Invasion ohne Stimuli und Attraktantien	48
Abb. 22. Migration mit CM der Patientin OC_112 als Stimulus im OK	49
Abb. 23. Migration der OCC in CM verschiedener Patientinnen	50
Abb. 24. Einfluss der CM-Konzentration auf die Migration (OC_37)	51
Abb. 25. Einfluss der CM-Konzentration auf die Migration (OC_91)	51

Abb. 26. Ohne Vor-Inkubation kein Einfluss der LPA auf Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht	53
Abb. 27. Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht nach Vor-Inkubation mit LPA	54
Abb. 28. Invasion unter Einfluss von LPA im OK	55
Tab. 1. OCMI-Medium und Inhaltsstoffe	27
Tab. 2. Chemikalien	28
Tab. 3. Verbrauchsmaterialien	28
Tab. 4. Testsubstanzen	29
Tab. 5. Patientendaten	30

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom stellt mit einer Inzidenz von 7350 in Deutschland 3,2 % aller weiblichen Tumorerkrankungen, mit einer Mortalität von 5400 jedoch über 5% aller tumorbedingten Sterbefälle dar. Das Ovarialkarzinom ist somit die fünfthäufigste krebssbedingte Todesursache der weiblichen Bevölkerung in Deutschland.

Wenngleich sich in den letzten Jahren die Therapie und - damit einhergehend – die Prognose vieler maligner Tumorentitäten verbessert haben, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen, die an einem Ovarialkarzinom erkrankt sind, nahezu unverändert bei ca. 40%. (Datenquelle: Krebs in Deutschland 2013/14 und 2015/16, Zentrum Für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Institut)

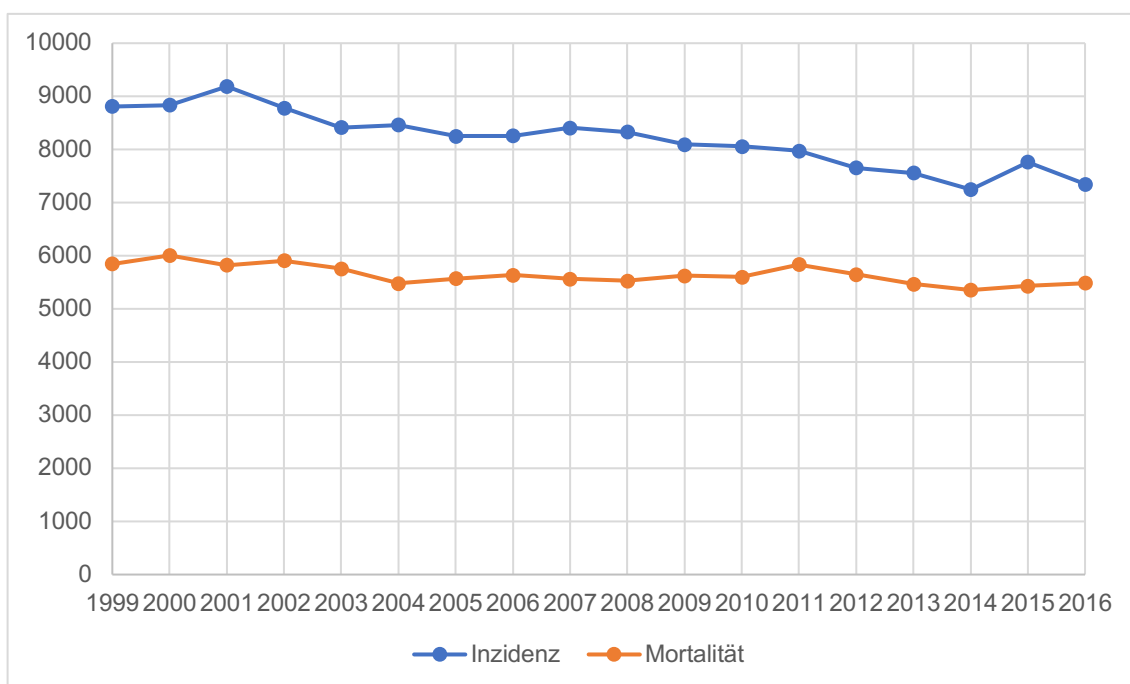


Abb. 1. Inzidenz und Mortalität des Ovarialkarzinoms in Deutschland (1999-2016)

1.2 Aktuelle Therapieempfehlung

Nach aktueller S3-Leitlinie wird für alle Patientinnen mit Nachweis eines intraepithelialen serösen Karzinoms ein umfassendes Staging zu der Bestimmung des FIGO Stadiums empfohlen, da sich die postoperative Nachsorge inklusive Chemotherapie hiernach richtet. In der FIGO-Klassifikation werden die uni- oder bilaterale Ausdehnung auf die Ovarien, die Infiltration von Organen des kleinen Beckens und extrapelviner Organe sowie das Vorkommen peritonealer oder extraperitonealer Metastasen berücksichtigt (AWMF S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren).

Mittels Längsschnittlaparotomie werden eine bilaterale Adnexektomie, Hysterektomie, Omentektomie sowie Exstirpation paraaortaler sowie pelviner Lymphknoten durchgeführt. Es werden Biopsien aus allen auffälligen sowie zufällige Biopsien aus unauffälligen Bereichen des Peritoneums zusammen mit Spülzytologien entnommen und histopathologisch analysiert. Ziel ist in jedem Fall die R0-Resektion des Primarius sowie die Resektion aller tumorbefallener Loci. An die Operation anschließend soll bei niedrig-malignem FIGO-1A und geringer Entdifferenzierung (G1) keine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden, bei mäßig entdifferenzierten (G2) können, bei hoch entdifferenzierten Tumoren (G3) sollen 6 Zyklen platinhaltige Chemotherapie gegeben werden.

Beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (FIGO IIB-IV) werden 6 Zyklen Carboplatin + Paclitaxel alle 3 Wochen empfohlen.

Das Therapiemonitoring sollte sonographisch sowie mittels Serum-CA-125 (sofern vor der Operation erhöht), insbesondere aber in Hinblick auf die Lebensqualität der Patientin erfolgen. (Buys, 2011)

1.3 Prozess der Metastasierung

1.3.1 Klassifikation und Metastasierung

Die verschiedenen histologischen Subtypen des Ovarialkarzinoms unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aggressivität deutlich voneinander, das HGSOC macht jedoch generell 80-85%, in FIGO-Stadium III-IV sogar 95% aller diagnostizierten Ovarialkarzinome aus. (Colombo et al., 2010)

Für die generell schlechte Prognose des diagnostizierten Ovarialkarzinoms sind verschiedene Faktoren verantwortlich. Vor allem zählen hierzu die schlechten Möglichkeiten der Früherkennung sowie das Fehlen geeigneter Screening-Methoden, kombiniert mit initial fehlenden bzw. gering ausgeprägten Symptomen erkrankter Frauen.

75% aller Diagnosen werden erst in fortgeschrittenen Stadien gestellt, eine Reduktion der Letalität durch Screenings (bspw. Tumormarker CA-125) in Kombination mit transvaginaler Sonographie konnte nicht nachgewiesen werden (Buys, 2011; Jacobs et al., 2016).

Nach heutigem Kenntnisstand entsteht das HGSOC nicht aus ovariellen Epithelzellen, sondern aus entdifferenzierten sekretorischen Epithelzellen der distalen Tuba uterina (Perets et al., 2013). Dieses Zystadenokarzinom infiltriert primär die Ovarien und im Verlauf dann benachbarte Bauch- und Beckenorgane. Während niedrig-maligne Ovarialkarzinome in nahezu 100% der Fälle eine BRAF- oder KRAS-Mutation aufweisen (Ramalingam, 2016), zeigen >90% aller HGSOC eine p53-Mutation (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011); hereditäre BRCA1/2-Mutationen spielen beim hoch-malignen Ovarialkarzinom eine untergeordnete Rolle. Die aktuelle WHO-Einteilung in high- und low-grade Ovarialtumore basiert lediglich auf histopathologischen Parametern (Kernaplasie & Mitoserate), nicht jedoch auf molekularpathologischen Differenzierungen.

Während eine hämatogene Metastasierung eher selten ist, metastasiert das HGSOC häufig lymphogen in pelvine und paraaortale Lymphknoten; die sog. „Abtropfmetastasen“ stellen allerdings den häufigsten Metastasierungsweg dar und bilden eine Besonderheit des Ovarialkarzinoms. Bereits in frühen Stadien lösen sich Tumorzellen vom Primärtumor und gelangen via Aszites zu anderen

peritonealen Organen, wo sie adhären und Metastasen bilden können. Dieser Prozess wird im Folgenden genauer erläutert.

Aufgrund fehlender spezifischer Frühsymptome werden solche peritonealen Metastasen oftmals erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch – etwa als (Sub-)Ileus durch Infiltration von Darmabschnitten oder als Hämaturie oder Harnverhalt durch Infiltration der Blase.

1.3.2 Primärtumor und maligner Aszites

Bei Patientinnen mit HGSOC spielen hämato- und lymphogene Metastasierung – im Unterschied zu vielen anderen Tumorentitäten – eine untergeordnete Rolle. Tarin et al. zeigten bereits 1984 an Ovarialkarzinom-Patientinnen mit peritoneovenösem Shunt bei therapierefraktärem Aszites, dass das Vorhandensein von Ovarialkarzinomzellen (*ovarian cancer cells*, im Folgenden mit OCC abgekürzt) im systemischen Kreislauf mitnichten in hämatogener Metastasierung resultiert (Tarin et al., 1984).

Bei Patientinnen mit HGSOC ist es die intraperitoneale Metastasierung, die maßgeblich für die schlechte Prognose verantwortlich ist.

Die Ovarien und Tuben sind als intraperitoneale Organe vom viszeralem Blatt des Peritoneums umgeben, welches in Zusammenspiel mit dem parietalen Blatt den Peritonealraum bildet, der physiologisch eine geringe Menge an Aszites enthält. Auf der einen Seite wird dadurch die Verschiebbarkeit der beiden Peritonealblätter gewährleistet, auf der anderen Seite können Tumorzellen, die sich vom Primärtumor der Adnexe ablösen, durch die peritoneale Flüssigkeit im gesamten Peritoneum verteilt werden und an verschiedensten Orten Metastasen bilden. Diese Art der Metastasierung kann man bei intestinalen Tumoren (v.a. gastrointestinale Adenokarzinome) beobachten. Insbesondere das HGSOC wird allerdings in der überwiegenden Anzahl der Fälle erst durch Symptome dieser Metastasen (z. B. (Sub-)Ileus bei Darminfiltration, geblähtes Abdomen, zunehmende Aszites-Bildung) auffällig; ein kurativer Therapieansatz ist in diesem Stadium meist unmöglich.

Diese bevorzugte Art der Metastasierung der Ovarialkarzinomzellen lässt sich besonders gut mit der von S. Paget bereits 1889 formulierten „Seed and soil“-Hypothese erklären. Da sowohl die epithelialen Zellen der Tuben als auch der Ovarien während der embryologischen Entwicklung aus Mesoderm entstehen, proliferieren sie besonders gut in Geweben, die der gleichen embryologischen Herkunft sind, also eine ähnliche Gewebshomöostase zeigen. Die Mesothelblätter sowie das Omentum bieten somit die besten Proliferationsbedingungen und sind Prädilektionsstellen für peritoneale Metastasen des Ovarialkarzinoms (Lengyel, 2010). Belege für diese Hypothese

gibt es beispielsweise für die pulmonale Metastasierung des malignen Melanoms (Fidler, 2003).

Die intraperitoneale Metastasierung beginnt im ersten Schritt mit dem Ablösen einzelner oder mehrerer Tumorzellen vom Primärtumor. Diesen Vorgang bezeichnet man als epithelial-mesenchymale Transformation (EMT); er stellt den Schlüsselprozess bei nahezu jeder Form der Metastasierung dar. Epitheliale Zellverbände stehen über Zell-Zell-Kontakte des Glykoproteins E-Cadherin und α - und β -Catenin in Verbindung. Im Rahmen der EMT kommt es zur Suppression der E-Cadherin-Expression und damit einhergehend zur Reduktion der Zell-Adhärenz an den benachbarten Epithelzellen sowie an der Basalmembran. Je geringer die E-Cadherin-Expression ist, desto größer die Invasivität der Tumorzellen; sie stellt somit einen prognostisch relevanten Wert dar, der mit reduziertem Überleben der betroffenen Patientinnen einhergeht (Daraï et al., 1997).

Verliert eine Zelle den Kontakt zur Basalmembran, wird sie normalerweise apoptotisch, man bezeichnet diesen Vorgang als Anoikis (von altgriechisch: ἀνοικίς ("anoikis") – heimatlos). Bei den Zellen des HGSOc kommt es im Rahmen der EMT zur Überwindung der Anoikis und somit zum gesicherten Überleben der Zellen während der Fortbewegung im Aszites. Casey et. al konnten in einem 3D-Spheroïd-Modell mit OCC zeigen, dass das Zusammenlagern einzelner Zellen zu sog. Spheroïden einen Überlebensvorteil bringt. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch β 1-Integrin, welches auch eine herausragende Rolle bei der Tumorzelladhäsion spielt (Casey et al., 2001), sowie durch die Hochregulation anti-apoptotischer (BCL-XL) sowie T-Zell-Regulations-Proteine vermittelt (Lengyel, 2010; Tan et al., 2006).

Nach EMT und überwundener Anoikis befinden sich nun einzelne Karzinomzellen oder Spheroïde im peritonealen Aszites, welcher dann als maligner Aszites bezeichnet wird. Über passive Fluktuation bewegen die Tumorzellen sich nun im Aszites und können an verschiedensten Stellen Sekundärläsionen bilden, sofern sie dort adhärieren und das Gewebe invadieren können.

Der maligne Aszites agiert nicht nur als Transportmittel für die Tumorzellen, sondern beinhaltet zudem lösliche Substanzen (Zytokine, Wachstumsfaktoren) und Immunzellen (insbesondere T-Zellen und tumorassoziierte Makrophagen),

die zur Proliferation und Dissemination der Karzinomzellen beitragen (Worzfeld et al., 2017). Dieses gesamte Mikromilieu wird zusammengefasst als Tumormikroumgebung (TME) bezeichnet.

1.3.3 Mesothelzellen und Tumorzelladhäsion

Sämtliche Organe mit Bezug zum Peritoneum sind von außen mit einem einschichtigen Mesothel, dem viszeralem Blatt, überzogen. Die Wände der Abdominalhöhle sind auf der komplementären Seite ebenfalls mit einschichtigem Mesothel überzogen, dem parietalen Blatt des Peritoneums.

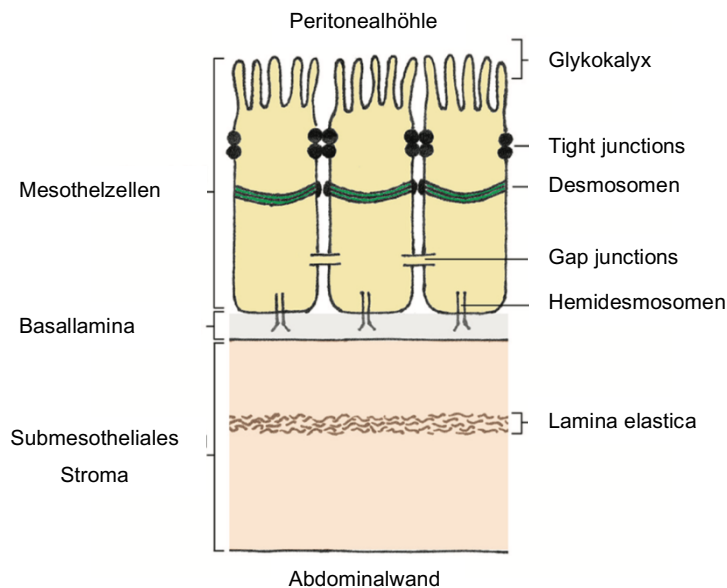


Abb. 2. Zellschichten des Peritoneums

Peritoneale Mesothelzellen sitzen mit der Basallamina dem submesothelialen Stroma auf. Sie sind untereinander via tight-junctions, gap-junctions und Desmosomen verbunden sowie hemidesmosomal in der Basallamina verankert. Die Basis zur Abdominalwand bilden das submesotheliale Stroma sowie Fibroblasten.

Abbildung modifiziert nach Van Baal et al. 2018.

Die kubischen Mesothelzellen sitzen einer Basallamina auf, die hauptsächlich aus Kollagen I und IV sowie Fibroblasten besteht und zusammen mit dem submesothelialen Stroma die extrazelluläre Matrix (ECM) der Mesothelzellen bildet (Kenny et al., 2009). Dieser strukturelle Aufbau findet sich an allen Organen, die Kontakt zur Peritonealhöhle haben.

Da OCC besser an Kollagenfasern der Basallamina adhärieren als an Epithelien, stellt die Mesothelzellschicht in gewisser Weise eine Barriere beim Prozess der Zelladhäsion dar (Burleson et al., 2004; Kipps et al., 2013).

Diese Hypothese wird gestützt durch die Erkenntnis, dass OCC offenbar nur dann die Mesothelzellschicht invadieren können, wenn diese vorher entweder bereits diskontinuierlich war (physiologisch, oder z.B. in Folge von Operationen) oder die Mesothelzellen an der Adhäsionsstelle eliminiert oder retrahiert werden konnten (Van Baal et al., 2018).

Geht man davon aus, dass die peritoneale Mesothelzellschicht primär kontinuierlich ist, so müssen Tumorzellen am Ort der Adhäsion zuallererst mittels Zell-Zell-Kontakten am Epithel anheften, um später überhaupt die Chance zur Invasion zu haben.

Die grundlegenden Mechanismen der Zell-Zell-Adhäsion im Rahmen der peritonealen Metastasierung der Ovarialkarzinomzellen (siehe Abb. 3) sind heutzutage größtenteils verstanden.

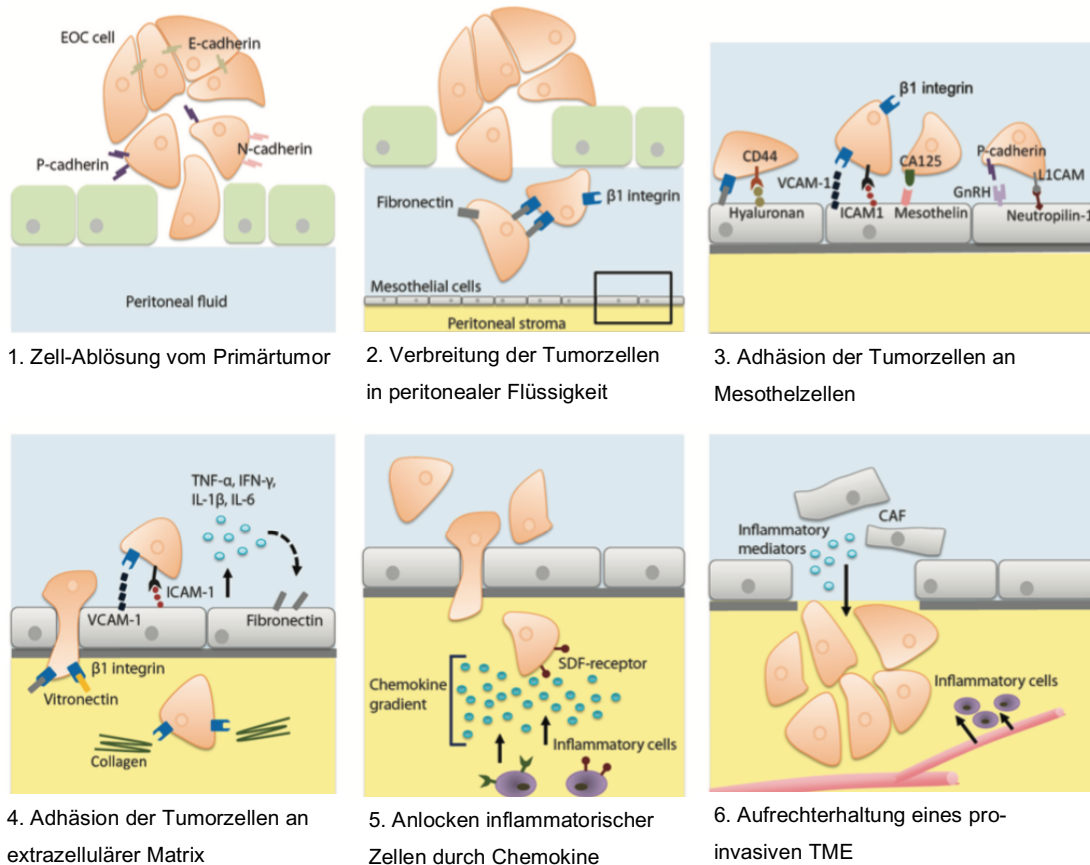


Abb. 3. Grundlegende Mechanismen der peritonealen Metastasierung der OCC

Wenn sich einzelne OCC vom Primärtumor des Ovars ablösen (1), verbreiten sich diese durch die passive Fluktuation der peritonealen Flüssigkeit innerhalb der Peritonealhöhle (2). Über verschiedenste Zell-Zell-Interaktionen adhärieren diese dann an Mesothelzellen (3) sowie Komponenten der ECM (4). Die invadierten OCC induzieren durch Anlocken inflammatorischer Zellen (5) die lokale Ausschüttung von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren (6).

Abbildung modifiziert nach Van Baal et al. 2018.

Betrachtet man das Mikromilieu der Tumorzellen genauer, findet man ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster zellulärer und löslicher Komponenten. Worzfeld et al. benannten hier maßgeblich den Aszites mit sämtlichen darin gelösten Stoffen, Exosomen, Immunzellen (insbes. tumorassoziierte Makrophagen und T-Zellen) sowie die Mesothelzellen mit der apikal ausgebildeten Glykokalix (Worzfeld et al., 2017). Mehrfach wurde bereits gezeigt, dass die Mesothelzellschicht - anders als früher angenommen - keine

vollständige Barriere darstellt, sondern vielmehr im Zuge des „Soil“-Aspektes ein Mikromilieu bietet, das die Proliferation und Invasion der Tumorzellen begünstigt. OCC können beispielsweise via CD44 an Hyaluronsäure, die Teil der Glykokalix der Mesothelzellen ist (Gardner et al., 1996), mittels β 1-Integrin (Strobel & Cannistra, 1999) an sezerniertes Fibronectin der Mesothelzellen (Kenny et al., 2014) sowie CA-125-vermittelt an Mesothelin adhären (Rump et al., 2004). Die Überexpression von CD44 steigert zudem die EMT (via SNAI1, ZEB1 und Caveolin-1) und korreliert mit einer schlechteren Prognose (Zhou et al., 2019). Ob bereits das physiologische peritoneale Milieu eine ausreichende metastatische Nische bildet, oder ob die Tumorzellen aktiv Einfluss darauf ausüben, wird heutzutage umfassend erforscht. So ist für einige Tumorentitäten evident, dass sie das Zielgewebe auf verschiedene Art und Weise prä-metastatisch beeinflussen können, um später Adhäsion und Invasion zu erleichtern (Costa-Silva et al., 2015; Hoshino et al., 2015; Kaplan et al., 2005). Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass bereits das Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten zwischen OCC und Mesothelzellschicht eine lokale inflammatorische Reaktion zur Folge hat, die zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen im Mesothel führt. Diese Zytokine (z.B. IL-1 β , TGF- β) können sich im Aszites verteilen und so eine generell erhöhte Adhäsionsbereitschaft – u.a. durch eine Änderung des mesothelialen zu einem myofibroblastischen HPMC-Phänotyp – induzieren (Van Baal et al., 2018).

Zur Untermauerung dieser These konnten Gerber et al. zeigen, dass Ovarial-, aber auch Bronchialkarzinomzellen intraperitoneal fast ausschließlich lymphozytenreiche und - hypothetisch damit einhergehend - Interleukin-reiche Areale sowie solche mit hoher Konzentration von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) invadieren (Gerber et al., 2006).

1.3.4 Tumorzellinvasion

1.3.4.1 Molekulare Mechanismen

Die kontinuierliche Mesothelzellschicht bildet eine Barriere, da sie Tumorzellen an der direkten Adhäsion am submesothelialen Stroma hindert. Wie oben bereits erwähnt, gibt es zwei Szenarien der Tumorzelladhäsion: Die Tumorzellen adhären an eine kontinuierliche Mesothelzellschicht, die sie überwinden müssen, oder sie können aufgrund einer bereits bestehenden Diskontinuität im Epithel unmittelbar an der ECM adhären.

Die Invasion durch eine intakte Epithelschicht stellt für Tumorzellen eine größere Herausforderung als die Invasion in ECM dar.

Es gilt als bewiesen, dass sich unter peritonealen Tumorsphäroiden keine Mesothelzellschicht mehr befindet. Iwanicki et al. zeigten mittels 3D-Modell, dass die Zell-Zell-Kontakte der Mesothelzellen durch mechanische - maßgeblich durch Talin- und Aktomyosin-vermittelte – Kräfte gelöst werden, sowie, dass Mesothelzellen durch den direkten Kontakt zu OCC angeregt werden, sich von diesen zu entfernen (Iwanicki et al., 2011).

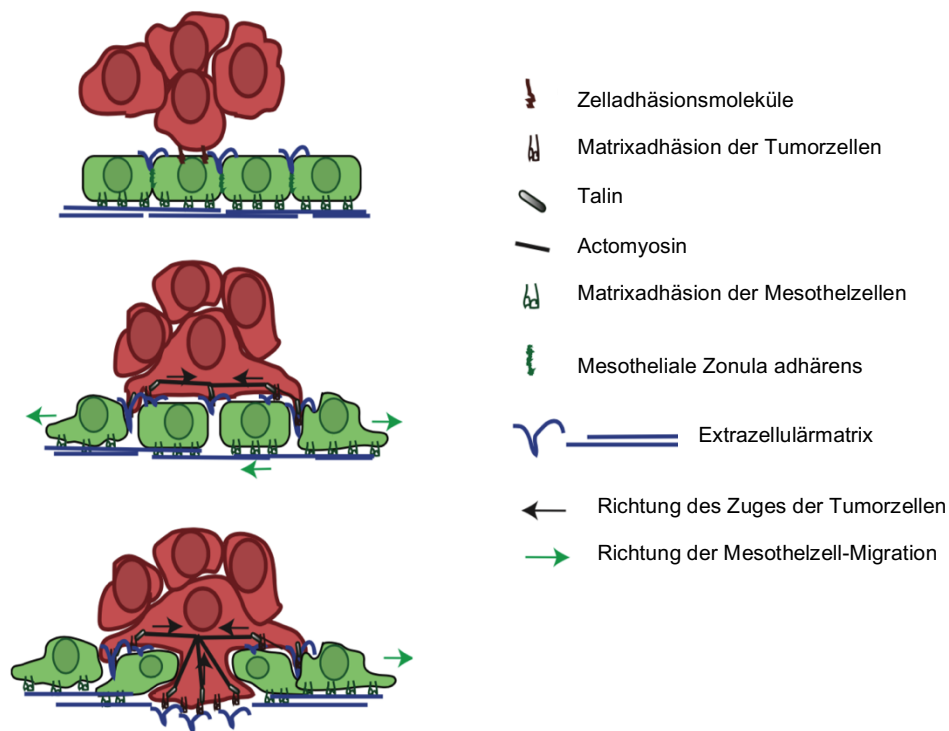


Abb. 4. Mesotheliale Clearance mittels Talin- und Aktomyosin

OCC-Spheroide adhären an eine kontinuierliche Mesothelzellschicht. Durch u.A. Myosin-vermittelte Kräfte induzieren die OCC die Dissoziation der Mesothelzellen und ermöglichen die Invasion.

Abbildung modifiziert nach Iwanicki et al. 2011.

Tumorzellen haben also nicht nur die Möglichkeit, Zell-Zell-Kontakte zwischen Epithelverbänden aufzulösen, sondern können durch Adhäsion an bestimmter Stelle sozusagen Epithelzellen aus dem Epithelverband verdrängen, um an dortiger Stelle ins submesotheliale Stroma invadieren zu können. Maßgeblich an diesem Prozess beteiligt ist $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, das Fibronectin auf den Mesothelzellen bindet und damit die Tumorzelladhäsion gewährleistet, um dann mechanische Kräfte auf die Mesothelzellen ausüben zu können.

Nach aktuellem Forschungsstand induzieren Entzündungsmediatoren wie IL-1 β und TNF- α im Aszites und TME auf ähnliche Art und Weise eine Retraktion der Mesothelzellen mit konsekutivem Freilegen des submesothelialen Stromas. Stadlmann et al. zeigten in-vitro, dass diese inflammatorischen Mediatoren nicht nur zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen ($\alpha 1,2,5$ - und $\beta 1$ -

Integrine), sondern ebenfalls zu einer signifikant verminderten Expression von basalen Ankerproteinen (insbesondere $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin, einem der wichtigsten basalen Verankerungen von Epithelzellen in der Extrazellulärmatrix) führen (Stadlmann et al., 2003). Somit ist zum einen durch den Verlust der basalen Verankerung und zum anderen durch die Retraktion der HPMC die Integrität der Mesothelzellschicht gestört und die Invasion erleichtert.

Der gesamte Prozess wird im Allgemeinen als *mesotheliale Clearance* bezeichnet.

1.3.4.1 LPA und LPAR

Neben Entzündungsmediatoren nehmen auch andere Stoffe im Aszites Einfluss auf die Adhäsion und Invasion von Tumorzellen.

Es ist bekannt, dass Lysophosphatidsäuren (*Lysophosphatidic acid*, im Folgenden mit LPA abgekürzt) bei verschiedenen Tumorentitäten mit gesteigertem Tumorwachstum, Progression sowie einer erhöhten Rezidivrate einhergehen (Li et al., 2009). Diese Effekte konnten auch für das Ovarialkarzinom nachgewiesen werden (Li et al., 2009; So et al., 2004).

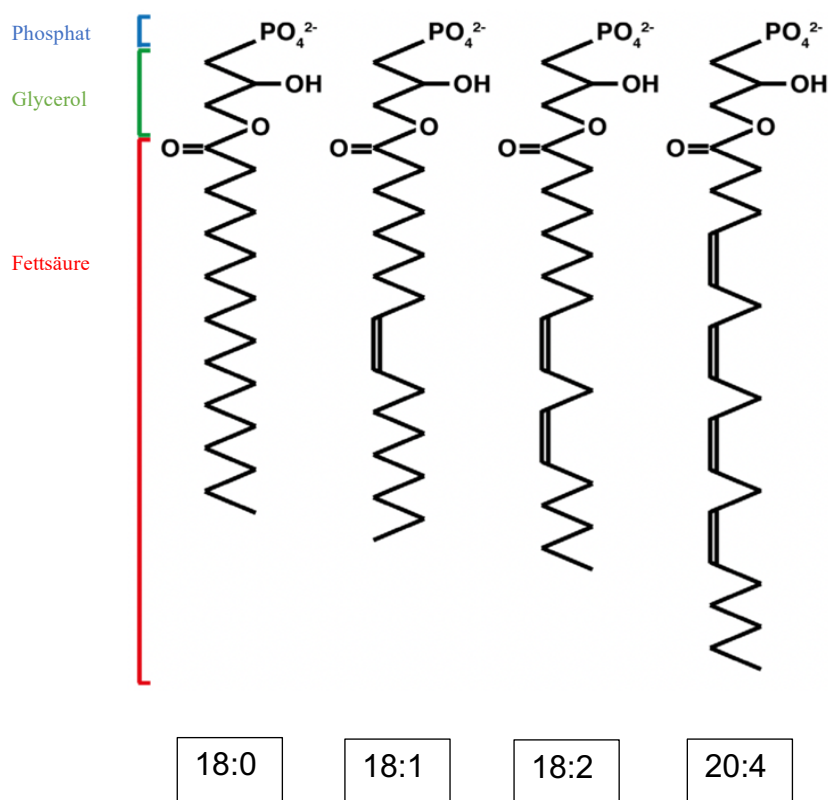


Abb. 5. Molekulare Struktur der LPA

Abbildung modifiziert nach Takeda et al., 2015.

LPA bestehen aus einem Glycerol-Phosphat-Rückgrat, das mit einer Fettsäure unterschiedlicher Kettenlänge mit variablem Sättigungsgrad verestert ist (siehe Abbildung 5).

Die Nomenklatur gibt die Kettenlänge sowie die Anzahl der Kohlenstoff-Doppelbindungen (entsprechen also dem Sättigungsgrad) an: LPA 18:1 trägt

also eine Fettsäure mit einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen, die einfach gesättigt ist.

LPA entstammen der Zellmembran und werden hauptsächlich über die Enzyme Phospholipase A2 (PLA2) sowie Autotaxin synthetisiert (siehe Abbildung 6).

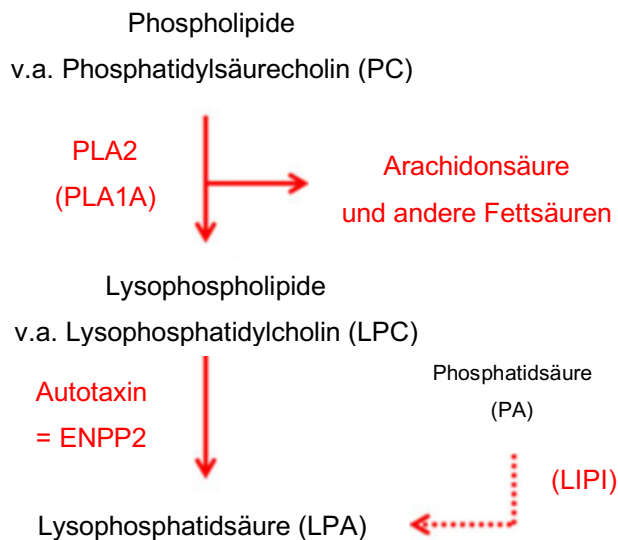


Abb. 6. Biosynthese der LPA in malignem Aszites an HGSOE erkrankter Patientinnen

Abbildung modifiziert nach Reinartz et al. 2019.

Im Kontext des Ovarialkarzinoms finden sich sowohl im Aszites als auch im Serum erkrankter Patientinnen erhöhte Konzentrationen der LPA, insbesondere 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 und 20:4 (Reinartz et al., 2019).

Heutzutage sind mindestens sechs verschiedene LPA-Rezeptoren (im Folgenden mit LPAR₁₋₆ abgekürzt) bekannt, die über verschiedene G-Proteine (G α s, G α i, G α _{12/13}, G α _{q/11}...) intrazelluläre Signalwege steuern (siehe Abbildung 7) (Yung et al., 2014).

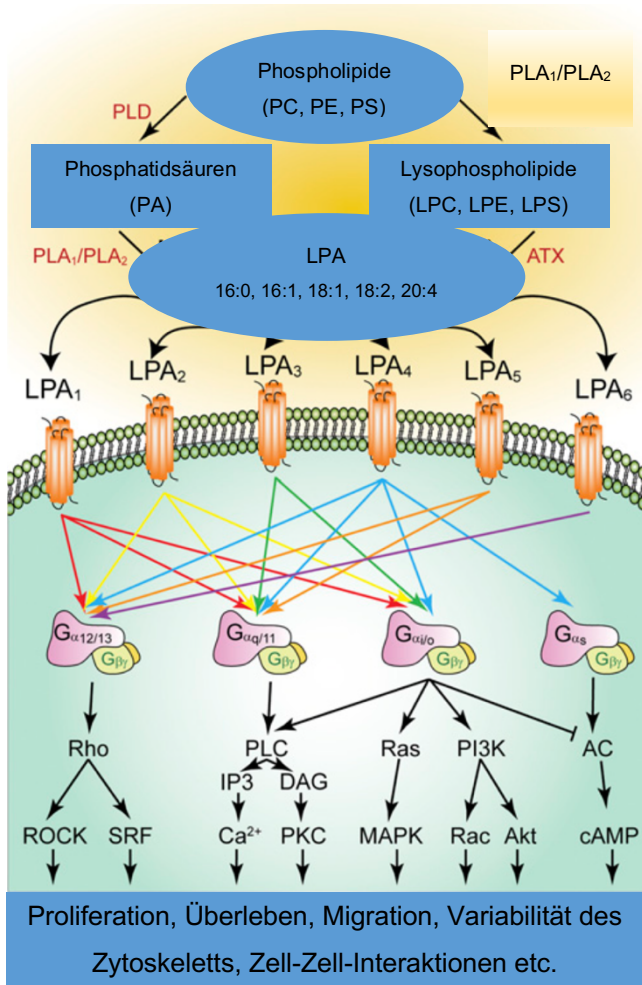


Abb. 7. Übersicht der Hauptsignalwege der LPAR

Die verschiedenen Subtypen der LPA (16:1, 18:0, 18:1 etc.) steuern über sechs verschiedene LPAR intrazelluläre Signalwege, die – an G-Proteine gekoppelt – zelluläre Funktionen steuern.

Enzyme der Biosynthese sind rot markiert.

Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phospholipase D (PLD), Autaxin (ATX).

Abbildung modifiziert nach Yung et al. 2014.

Insbesondere beim epithelialen Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass LPA zu einer gesteigerten EMT (Suppression des Tumorsuppressors SIRT1 (Ray et al., 2017)), Migration (Aktivierung des pro-migratorischen ras-Proteins (Bian et al., 2004)), Tumorzelladhäsion (gesteigerte Expression von β 1-Integrinen) sowie Tumorzellinvasion (gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP) (Fishman et al., 2001) sowie Cyclooxygenase-2) (Symowicz et al., 2005) führen.

1.3.4.2 Mikromilieu der Tumorzellen

Neben LPA wirken eine Vielzahl löslicher Stoffe aber auch zelluläre Interaktionen auf die Tumorzellen ein und bilden ein komplexes Zusammenspiel regulierender sowie induzierender Faktoren in Bezug auf Migration, Adhäsion und Invasion. Gegenstand aktueller Forschungen ist die Zuordnung von Herkunft der Wirkstoffe und Ort der Wirkung, da in-vitro Studien häufig den Wirkmechanismus bestimmter Stoffe, jedoch nicht die Umstände, unter welchen diese Stoffe von den jeweiligen Zelltypen freigesetzt werden, untersuchen.

Wie unter 1.3.2 genannt sind neben HPMC und OCC sowohl tumorassoziierte Makrophagen als auch regulatorische T-Zellen wichtiger Bestandteil des TME.

Makrophagen steigern die Angiogenese, bewirken ein prä-metastatisches Priming der HPMC und supprimieren lokal die anti-tumoröse Immunantwort (Noy & Pollard, 2014); letzteres geschieht ebenso durch regulatorische T-Zellen im TME. Je größer die Anzahl regulatorischer T-Zellen im TME im Verhältnis zu anti-tumorösen Immunzellen (z.B. zytotoxische T-Zellen) ist, umso schlechter das klinische Outcome der Patientinnen (Landskron et al., 2015; Preston et al., 2013). Ein weiterer Fokus aktueller Forschung sind extrazelluläre Mikrovesikel, die von tumorassoziierten Zellen innerhalb des malignen Aszites in diesen freigesetzt werden und über transportierte Proteine, Nukleinsäuren und Fette das Verhalten der Tumor-, aber auch Mesothel- sowie Immunzellen maßgeblich beeinflussen können. Hierzu zählen etwa die inhibierte Abtötung der Tumorzellen durch natürliche Killerzellen oder die gesteigerte Invasion und Chemoresistenz der OCC (siehe Abbildung 8) (Worzfeld et al., 2017).

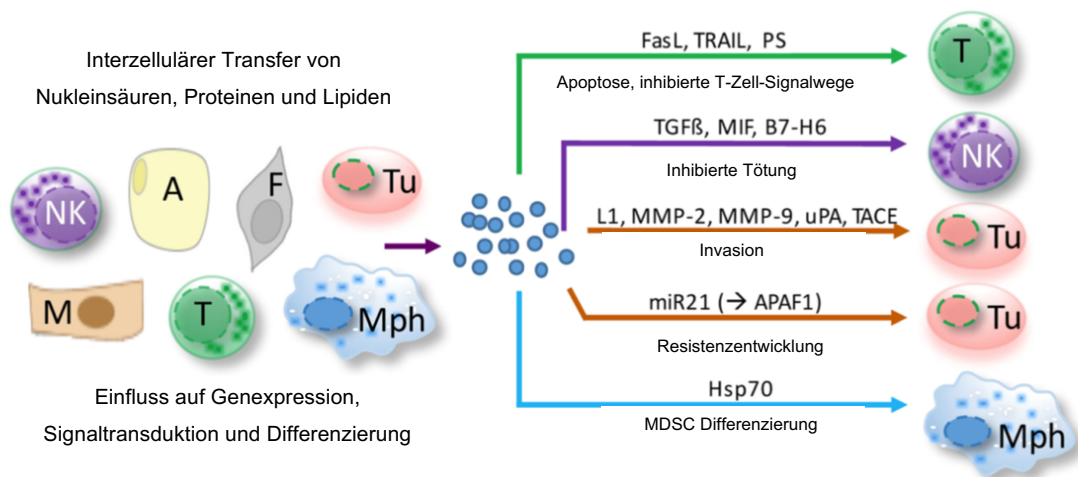


Abb. 8. Funktion verschiedener extrazellulärer Mikrovesikel in malignem Aszites

Die verschiedenen Zellen des TME beeinflussen mittels extrazellulären Mikrovesikel die dargestellten Signalwege und beeinflussen Wachstum und Metastasierung der OCC.

(A: Adipozyten, F: Fibroblasten, M: Mesothelzellen, Mph: Makrophagen, NK: Natürliche Killerzellen sowie Tu: Tumorzellen)

Abbildung modifiziert nach Worzfeld et al. 2017.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 OCMI-Medium und Inhaltsstoffe

Reagenz	Hersteller	Endkonzentration
DMEM/Ham'2 F12 + 2mM stab. Glutamin	Milipore / Biochrom	46,86 %
M199 Medium + 2mM stab. Glutamin	Milipore	46,86 %
Steriles Fetales Kälber- Serum (FCS)	Biochrom	5 %
Insulin	Sigma	20 µg/ml
Rh. Epithelial Growth Factor	Gibco	10 ng/ml
Hydrokortison	Sigma	500ng/ml
Cholera-Toxin	Sigma	25 ng/ml
HEPES		10 mM
Transferrin	Sigma	10 µg/ml
Triiodthyronin	Sigma	0,2 pg/ml
O-Phosphoryl- Ethanolamin	Sigma	5 µg/ml
Selensäure	Sigma	8 ng/ml
All-trans Retinolsäure	Sigma	25 ng/ml
Linolsäure	Cayman Chemical Best	5 µg/ml
Penicillin/Streptomycin (100x)	Capricorn Scientific	1 %

Tab. 1. OCMI-Medium und Inhaltsstoffe

Das *Ovarian Carcinoma Modified Ince Medium* (im Folgenden mit OCMI-Medium abgekürzt) (Ince et al., 2015) wurde unter sterilen Bedingungen in 50 ml Zentrifugenröhrchen der Marke Sarstedt aufgesetzt, spätestens alle 2 Wochen erneuert, bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.1.2 Chemikalien

	Hersteller
Steriles Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Phosphate buffered saline (PBS)	Capricorn Scientific
Trypsin- Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA)	Capricorn Scientific
Zelltracker CellTrace Oregon Green 488 Carbonsäure-Diazetat	Thermo Fisher

Tab. 2. Chemikalien

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
10 cm Petri-Schale (Primärzellkultur)	Falcon
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
96 Well-Plate Transwell, 8 µm Poren-Größe	Corning
96 Well-Plate Standard	Sarstedt

Tab. 3. Verbrauchsmaterialien

2.1.4 Testsubstanzen

	Hersteller
LPA 16:0	Avanti Polar Lipids
LPA 18:0	Avanti Polar Lipids
LPA 18:1	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
LPA 18:2	Echelon Biosciences, Inc. (Salt Lake City, UT, USA)
LPA 20:4	Echelon Biosciences, Inc. (Salt Lake City, UT, USA)
LC-MS Ethanol (EtOH)	Honeywell (Seelze, DE)
FITC-Dextran 70 kDa	Sigma
HBSS-Puffer	Thermo Fisher
Anti-ZO-1 Antikörper, Clone R40.76, MABT11	Sigma Aldrich
Goat Anti-Rat-IgG Sekundärantikörper Alexa Flour 488	Thermo Fisher
DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole)	Thermo Fisher

Tab. 4. Testsubstanzen

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Tumor- und Mesothelzellen

Maligner Aszites wurde von HGSOE-Patientinnen, welche in der Gynäkologie des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg behandelt wurden, entnommen. Wie von Reinartz et al. beschrieben, wurden einzelne Tumorzellen sowie Tumorzell-Spheroide mittels Zellsieb (30 & 40 µm Porengröße) aufgetrennt und mittels CD45-Microbeads-FACS von peritonealen Lymphozyten getrennt (Reinartz et al., 2016).

Abbildung 9 zeigt eine Auflistung der entsprechenden Patientendaten.

Zellart	Patientin	Alter	Histologie	Grading	T-Stadium	N-Stadium
OCMI Tumorzellen						
	OC_37	61	serös	G2	pT3c	0
	OC_91	63	serös	G3	pT3c	1
HPMC						
	OC_111	63	serös	low grade	pT3c	1
	OC_112	57	serös	G3	pT3c	1
	OC_121	79	serös	high grade	pT3c	0
	OC_150	84	endometrioid	G2	pT1c	0

Tab. 5. Patientendaten

Auflistung von Pseudonym, Alter, histologischem Subtyp, Grading sowie T- und N-Stadium der Patientinnen, deren Zellen von mir in Kollaboration mit der AG Reinartz des ZTI Marburg untersucht wurden.

2.2.2 Zellkultur

Kultivieren der Mesothelzellen

Die humanen primären Mesothelzellen (im Folgenden mit HPMC abgekürzt) wurden auf 10cm-Platten in OCMI-Medium bei 37° Celsius und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage erneuert und die Zellen wurden alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt, die Platten mit PBS gespült, Trypsin-EDTA hinzugegeben und nach Ablösen der Zellen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in frischem OCMI-Medium auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt.

Die Zellzahl der Suspension wurde manuell mittels Lichtmikroskopie ausgezählt, das entsprechende Volumen für die Besiedlung der Wells wurde entnommen und die verbleibenden Zellen wurden zur weiteren Kultivierung auf neue 10cm-Platten in Kulturmedium gegeben.

Kultivieren der Ovarialkarzinomzellen

Die humanen OCC wurden ebenfalls in OCMI-Medium bei 37° Celsius und 5% CO₂ kultiviert. Sowohl Separierungs- als auch Trypsinierungs- und Zählprozesse entsprechen denen der HPMC.

2.2.3 Vorbereitung des Adhäsions- und Invasionsassays

Besiedlung der 96-Well-Platten

Die Transwells bestehen jeweils aus einem oberen und einem unteren Kompartiment, wobei beide durch eine Membran mit Poren des Durchmessers 8 μM voneinander getrennt sind. An der Unterseite der mit Poren versehenen Membran adhären die Zellen, die die Poren passieren konnten. Dies ermöglicht den OCC, vom oberen ins untere Kompartiment zu migrieren und an der unteren Seite der Membran zu adhären. 15 μL bovines Typ-I-Kollagen wurden gleichmäßig auf der Poren-Membran verteilt und zur Aushärtung für mindestens 30 Minuten bei 37° inkubiert. Das obere Kompartiment wurde einmalig mit PBS gespült und mit 50 μl Kulturmedium befüllt.

Pro Well wurden etwa 11.000 Mesothelzellen gesetzt; anschließend wurde das untere Kompartiment mit OCMI-Medium befüllt.

Die 96-Well-Platten wurden bei 37° und 5% CO_2 inkubiert, während das Kulturmedium im oberen Kompartiment alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde. Nach 10-14 Tagen haben die Mesothelzellen auf der Kollagenbeschichtung der Membran ein kontinuierliches, einschichtiges Epithel gebildet. Bei lichtmikroskopischem Nachweis der vollständigen Epithelschicht wurden exemplarisch zwei Wells lasermikroskopisch überprüft (siehe Abschnitt **Zell-Markierung und Überprüfung mittels Lasermikroskop**). Der Assay wurde gestartet, wenn auch hier eine kontinuierliche Epithelschicht nachgewiesen werden konnte.

Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden 96 Well-Platten der Firma Sarstedt benutzt, die Kollagenbeschichtung sowie HPMC-Besiedlung wurde analog zum Invasionsassay durchgeführt. Aufgrund der größeren Well-Fläche (Faktor 2.5 verglichen mit den Wells der 96 Well Invasionsplatte) wurden pro Well 40 μL Typ-I-Kollagen sowie 20.000 HPMC genutzt.

Migrations-Assay

Für den Migrations-Assay wurden ebenfalls 96-Well-Transwell-Platten genutzt, allerdings nur mit Typ-I-Kollagenbeschichtung ohne Mesothelzellschicht.

Zell-Markierung der Mesothelzell-Schicht und Überprüfung mittels Lasermikroskop

Zur Verifizierung der kontinuierlichen Epithelschicht wurden 2 Wells exemplarisch ausgewählt, die HPMC mittels Zelltracker markiert und lasermikroskopisch kontrolliert.

Hierfür wurde das Kulturmedium des oberen Kompartiments entfernt, Zelltracker wurde im Verhältnis 1:1000 mit serum-freiem Kulturmedium gemischt und anschließend 50 µl in beide Wells pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde das Zelltracker-Medium entfernt und oberes sowie unteres Kompartiment der Wells mit PBS gewaschen; eine kleine Menge PBS verblieb während des Mikroskopierens in beiden Kompartimenten, um die Zellen in Lösung zu halten. Mit dem Lasermikroskop wurde überprüft, ob die Epithelschicht kontinuierlich ausgebildet ist; entsprechende Bilder wurden als Nachweis aufgenommen.

Zell-Markierung der OCC

Für den Invasions-Assay wurden die OCC vor dem Start zentrifugiert (1), mit Zelltracker (1:1000 in DMEM / HAM's F12) suspendiert (2) und 30 Minuten bei 37° C inkubiert (3). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS und lichtmikroskopisch-manuellem Auszählen (4) wurden pro Well 6000 Zellen in einem separaten Eppendorfgefäß vorbereitet (5).

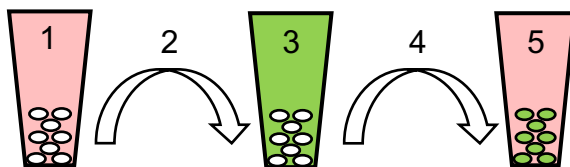


Abb. 9. Schematische Darstellung der Zell-Markierung

2.2.4 Durchführung der Assays

Adhäsions-Assay

Für den Adhäsions-Assay wurden pro Well 6000 markierte OCC (grün) in serum-freiem OCMI-Medium (rot) suspendiert, die Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt und auf die entsprechenden - mit Kollagen-I (grau) und einem einschichtigen HPMC-Epithel (gelb) bedeckten - Wells der 96-Well-Platte gegeben (1). Während des Adhäsion-Zeitraums wurden die 96-Well-Platten bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert (2). Nach mehrmaligem Spülen (3) wurden mit dem Mikroskop (4) drei Bilder (5) aus der Mitte des Wells zur Quantifizierung aufgenommen. Die Randbereiche wurden nicht quantifiziert, da hier vermehrt Wandartefakte (blau) auftraten. Die Quantifizierung erfolgte in derselben Weise wie beim Invasions-Assay.

Die OCC wurden mindestens 20h vor dem Assay in serum-freiem Kulturmedium kultiviert, anschließend erfolgte das Procedere wie oben beschrieben. Zur Vorbehandlung mit LPA wurden die OCC auf eine 6-Well-Platte aufgeteilt und ebenfalls über einen Zeitraum von mindestens 20h in serum-freiem Kulturmedium kultiviert; die LPA wurden in >99,8% Ethanol vorverdünnt und anschließend in angegebener Konzentration für 24h hinzugegeben. Während des Assays lagen die LPA in serum-freiem Medium in gleicher Konzentration vor wie bei der Vorbehandlung.

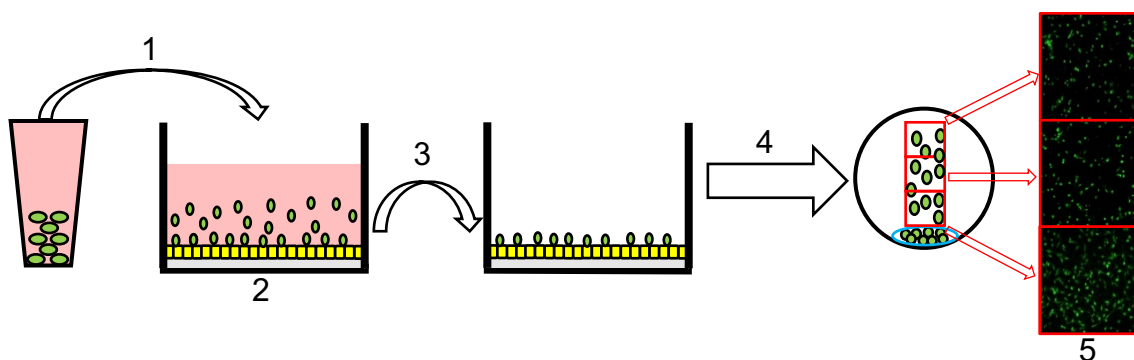


Abb. 10. Schematische Darstellung des Adhäsions-Assays

Migrations- / Invasionsassay

Für den Invasions-Assay wurden pro Well 6000 markierte OCC in serum-freiem OCMI-Medium suspendiert (1-2) und auf die entsprechenden Wells der 96-Well-Platte gegeben (3). Während des Invasions-Zeitraums wurden die 96-Well-Platten bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert.

Die zu testenden Stoffe wurden in das obere (im Folgenden mit OK abgekürzt), untere (im Folgenden mit UK abgekürzt) oder in beide Kompartimente (im Folgenden mit B abgekürzt) hinzugegeben.

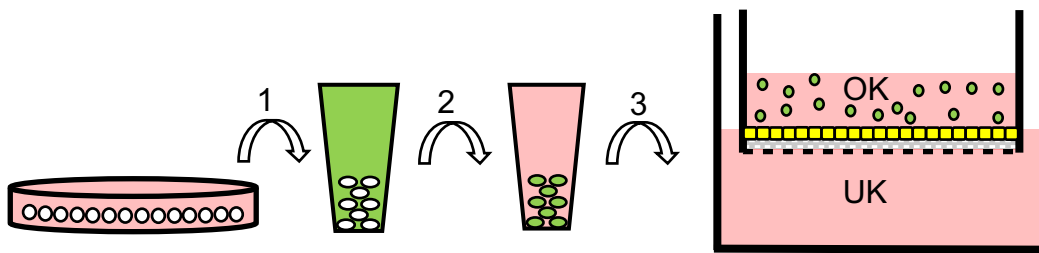


Abb. 11. Schematische Darstellung des Migrations- / Invasionsassays

Beendigung des Assays und Zell-Entfernung

Der Assay wurde 24/48h nach Beginn beendet. Zuerst wurden mittels Vakuum-Saugpipette das Medium sowie die noch suspendierten Zellen des oberen Kompartiments entfernt (1), anschließend wurde mit PBS gewaschen (2). Durch zirkuläres Drehen eines in PBS getränkten Wattestäbchens wurden die oberhalb der Membran anhaftenden Ovarialkarzinom- und Mesothelzellen abgelöst und durch mehrmaliges Auswaschen mit PBS entfernt (3).

Quantifizierung der invadierten OCC

Durch das Entfernen der Zellen sowie des Mediums des oberen Kompartiments verbleiben in den Transwells lediglich die Zellen, die die Poren-Membran zwischen dem oberen und unteren Kompartiment – und damit auch Mesothelzell- sowie Kollagenschicht – durchdringen konnten. Sie sind mit Zelltracker markiert und befinden sich auf der Unterseite der Membran. Mit konfokalem Mikroskop wurde pro Well ein Bild aus der Mitte des Wells zur Quantifizierung aufgenommen (4).

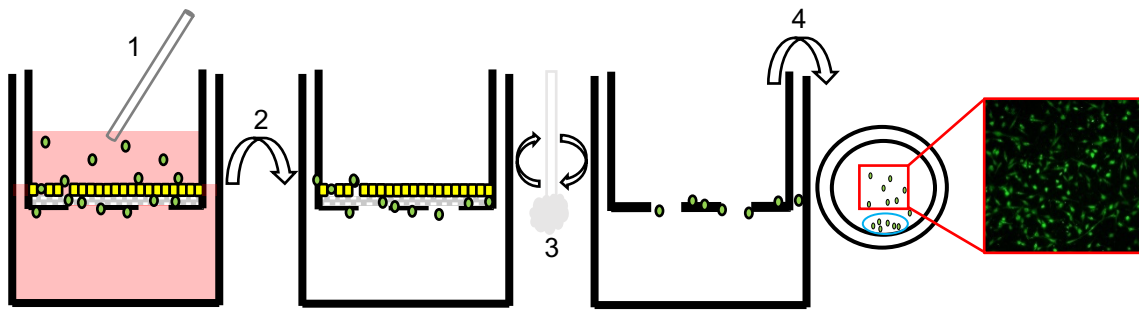


Abb. 12. Schematische Darstellung von Beendigung & Quantifizierung

Quantifizierung mittels ImageJ

Alle Aufnahmen der Ergebnisse eines Assays wurden mittels Threshold-Differenzierung in ImageJ angepasst und automatisch mit „Analyze particles“ nach entsprechender Größe analysiert. Anschließend erfolgte für alle analysierten Bilder eine manuelle Kontrolle der Auszählung.

2.2.5 FITC-Dextran-Assay

Der FITC-Dextran-Assay wurde auf den 96-Well-Platten des Invasionsassays durchgeführt. Ebenfalls wurden 11.000 HPMC auf eine Kollagen-Matrix gesetzt und bis zum Ausbilden einer kontinuierlichen Epithelschicht in OCMI-Medium kultiviert. Die Kontinuität wurde ebenfalls licht- und lasermikroskopisch überprüft. FITC-Dextran der Größe 20 und 70 kDa wurden in HBSS-Puffer verdünnt; dieser wurde zudem als negative Kontrolle genutzt.

FITC-Dextran wurde nun in das OK von Wells mit kontinuierlicher HPMC-Schicht, Wells mit alleiniger Kollagen-Beschichtung sowie in Wells ohne Kollagen und HPMC gegeben. Nach einer Stunde wurde das OK aus den Wells entfernt und die Absorptionsrate des UK mittels Plate-Reader bestimmt.

Zur Auswertung wurde die Absorptionsrate des UK in Relation zu den leeren Wells (hier konnte das FITC-Dextran ungehindert durch die Porenmembran diffundieren, entsprechend 100%) und den Negativ-Kontrollen (die lediglich HBSS-Puffer beinhalteten, entsprechend 0%) gesetzt.

2.2.6 DAPI- / ZO-1-Immunfluoreszenzfärbung

22.000 HPMC wurden auf IBIDI-Wells in gleicher Art und Weise wie auf die Transwells gesetzt und in OCMI-Medium kultiviert, bis lichtmikroskopisch eine kontinuierliche Epithelschicht nachgewiesen wurde. Die folgenden Prozentangaben beziehen sich auf die Verdünnungsstufe in PBS.

Die Wells wurden mit 8% Formaldehyd fixiert, mehrfach mit PBS gewaschen, die HPMC mit 0,2% Triton permeabilisiert und anschließend mit 4% FCS geblockt. Der Primärantikörper (Anti-ZO-1-IgG) wurde 1:100 in 0,2% Triton und 2% FCS verdünnt und auf die Wells gegeben, anschließend bei hoher Luftfeuchtigkeit, Dunkelheit und 4° Celsius über Nacht inkubiert.

Hiernach wurde mehrfach mit 1% FCS gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper (Anti-rat-IgG Alexa Flour 488) in 1,5% FCS für 30-60 Minuten inkubiert.

Zum Abschluss wurden die HPMC noch 30 - 60 Minuten mit DAPI (1:500) gefärbt und abschließend mehrfach mit PBS gewaschen.

Die Bilder wurden ebenfalls mit einem Zeiss LSM 700b konfokalen Mikroskop bei den Wellenlängen 492/517 nm (Anti-IgG-Sekundärantikörper) & 358/461 nm (DAPI) aufgenommen.

2.2.7 Gewinnung des konditionierten Mediums der Mesothelzellen

Zur Gewinnung des HPMC-konditionierten OCMI-Mediums (im Folgenden mit CM abgekürzt) wurden HPMC auf einer 10cm-Zellkulturschale bis zur Ausbildung einer kontinuierlichen Epithelschicht kultiviert. Anschließend wurde das OCMI-Medium entfernt und serum-freies OCMI-Medium hinzugegeben. Nach 24h wurden das nun konditionierte Medium entnommen und darin verbliebene Zellen durch mehrfaches Zentrifugieren entfernt. Das CM wurde unmittelbar für Versuche benutzt und weder gelagert noch wiederverwendet.

2.3 Angewandte Statistik

Die Populationsgröße meiner Versuche beschränkt sich durch die aufwändige Kultivierung und Aufbereitung der Primärzellen auf eine geringe Menge an Wells, deren Zellen quantifiziert wurden. Da zudem keine gaußsche Normalverteilung der Ergebnisse vorlag, entschied ich mich für die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Die Grundvoraussetzungen für diesen statistischen Test werden erfüllt und das Signifikanzniveau wird im Folgenden mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0.001$) angegeben.

3. Ziel der Arbeit

Das primäre Ziel meiner Arbeit ist die Etablierung eines dreidimensionalen Invasionsassays, um die peritoneale Metastasierung der OCC in-vivo möglichst detailliert in-vitro darzustellen. Da insbesondere der dreidimensionale Aufbau des Peritoneums bisher in Experimenten nicht ausreichend abgebildet wird, stellen die Entwicklung des neuartigen Invasionsassays sowie die Verifizierung und Reproduzierbarkeit der in diesen Assays erzielten Ergebnisse den Hauptteil dieser Arbeit dar.

So können zukünftig in-vitro spezifische Angriffspunkte gefunden, analysiert und für therapeutische Zwecke herangezogen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung des neuartigen dreidimensionalen Invasionsassays

Um die zeitlichen und praktischen Abläufe des neuartigen, dreidimensionalen Invasionsassays an die Fragestellung anzupassen und zu überprüfen, ob bereits evidente Ergebnisse aus anderen in-vitro Assays mit meinen Assays reproduzierbar sind, wurden zunächst Testversuche durchgeführt.

Wie bereits mehrfach gezeigt wurde, adhären OCC besser an Kollagenfasern (insbesondere Kollagen I (Iwanicki et al., 2011, Moser et al., 1996)) der ECM als an der kontinuierlichen Mesothelzellschicht. Dies konnte in den Versuchen reproduziert werden.

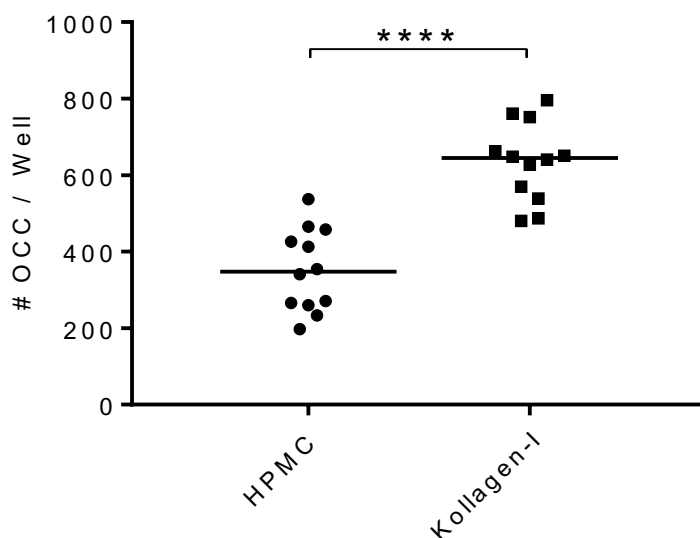


Abb. 13. Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht vs. Kollagen-I

Die Adhäsion der OCC (OC_37) an einer kontinuierlichen HPMC-Schicht nach einer Stunde verglichen mit der Adhäsion Kollagen-I.

Adhäsions-Assays verschiedener Dauer zeigten, dass im Zeitraum von 30 bis 360 Minuten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der adhärierenden OCC-Zellzahl sichtbar waren.

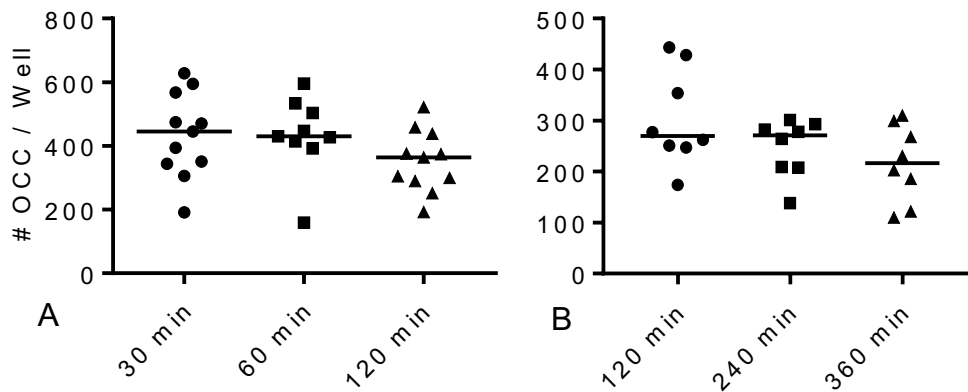


Abb. 14. Adhäsion der OCC an kontinuierlicher HPMC-Schicht im Zeitverlauf
Die Adhäsion von 6000 OCC (OC_37) an einer kontinuierlichen HPMC-Schicht, gemessen nach 30, 60 und 120 Minuten (A) sowie nach 120, 240 und 360 Minuten (B).

Eine Dauer des Assays von 60 Minuten wurde festgelegt, um das Intervall ohne Manipulation an den OCC ausreichend groß zu halten.

4.1.1 Epithelschicht mit mechanischer und funktioneller Barrierefunktion

Da mit diesem dreidimensionalen Invasionsassay die Invasion beginnend mit der Zell-Zell-Adhäsion der OCC am Mesothel abgebildet wird, ist Voraussetzung, dass zu Beginn keine direkte Adhäsion der OCC an Kollagen der Extrazellulärmatrix möglich ist. Dasselbe gilt für den Adhäsionsassay.

Um zu gewährleisten, dass keine relevanten Diskontinuitäten zwischen den Mesothelzellen vorhanden sind, konnte ich zeigen, dass HPMC in-vitro tight-junctions ausbilden (Abb. 15A) und nach 10-14 Tagen eine kontinuierliche Epithelschicht formen (Abb. 15B).

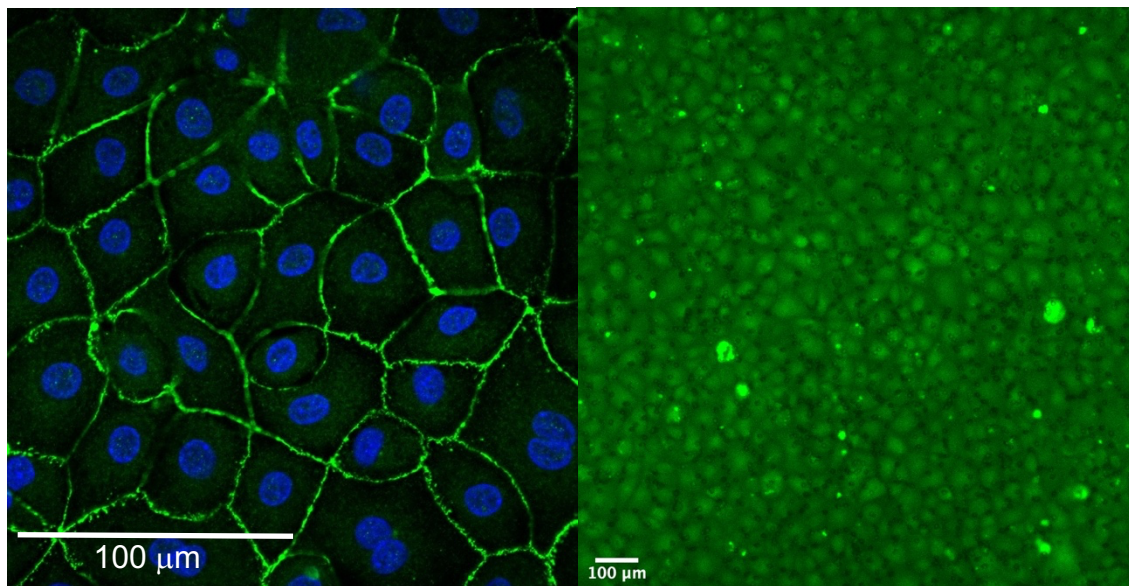


Abb. 15. A: Immunhistochemisches Staining der HPMC-Epithelschicht für ZO-1 (grün) und DAPI (blau); **B:** HPMC-Schicht mit zytoplasmatischem Zelltracker (grün)

Um nicht nur die mechanische, sondern auch die funktionelle Barrierefunktion der HPMC-Schicht nachzuweisen, wurden Assays mit FITC-Dextranen der Größe 70 kDa durchgeführt.

Bei kontinuierlicher HPMC-Schicht konnte im UK eine Reduktion der Absorption von etwa 50% beobachtet werden.

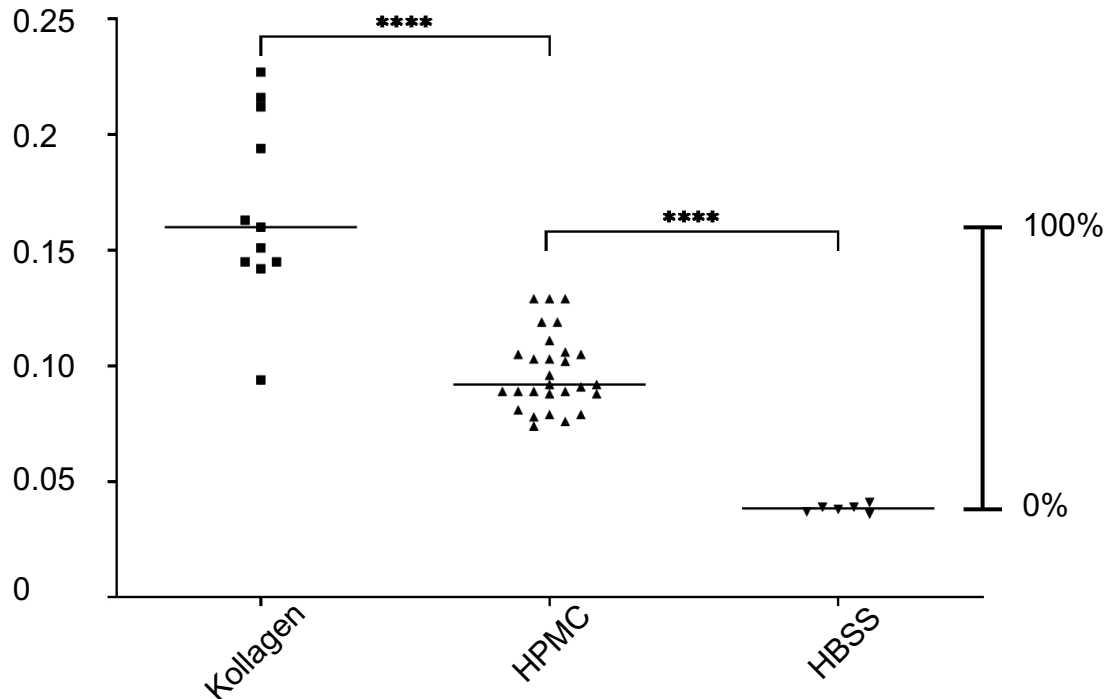


Abb. 16. Funktionelle Barrierefunktion der HPMC-Schicht

Gemessen wurden die absolute (linke Y-Achse) und relative Absorption (rechte Y-Achse) im UK der Transwells bei Assays mit FITC-Dextran der Größe 70 kDa nach einer Stunde. Als positive Kontrolle wurde die Absorption im UK der Wells mit alleiniger Kollagen-I-Beschichtung (=100%), als negative Kontrolle die Absorption im UK der Wells ohne FITC-Dextran (=0%) gemessen.

4.1.2 Validierung der Messergebnisse

Es existieren viele Versuchsarten, um die Tumorzell-Migration und -invasion in-vitro nachzubilden. Wie bereits beschrieben, müssen Tumorzellen bei intraperitonealer Metastasierung zuerst an der Mesothelzellschicht adhären, diese überwinden und danach durch die freigelegte Diskontinuität im Mesothel ins submesotheliale Bindegewebe invadieren. Ich fokussiere mich auf die Schritte von Tumorzelladhäsion bis hin zur Tumorzellinvasion.

4.1.2.1 Quantifizierte Zellen sind Tumorzellen und submesothelial invadiert

Zur Überprüfung der Funktionalität des Versuchs ist es wichtig, dass man zur quantitativen Auswertung der invadierten Zellen wirklich nur jene Zellen quantifiziert, die vorher mit dem Zelltracker markiert wurden (also OCC sind) sowie submesothelial invadiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne Zelltracker-Markierung im konfokalen Mikroskop kein Signal geben, sodass sie nicht fälschlicherweise mitgezählt werden.

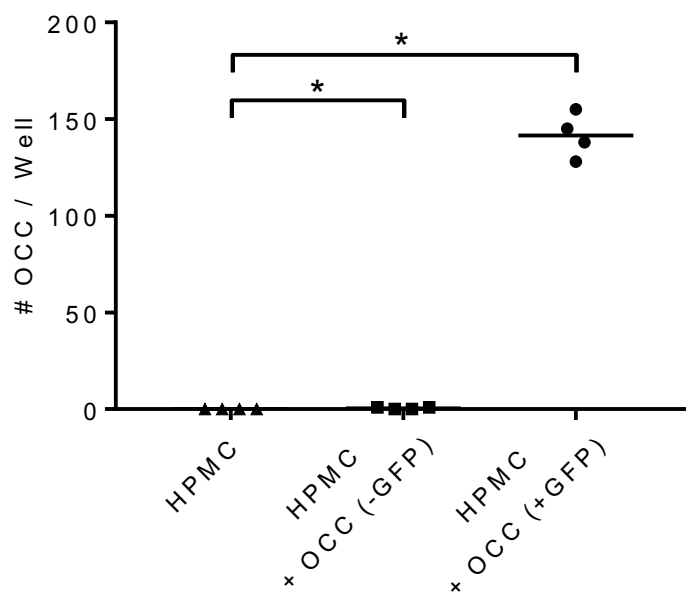


Abb. 17. Quantifizierung sichtbarer Zellen im Floureszenzmikroskop

Nach standardisierter Messmethode wurden alle sichtbaren Zellen eines Wells quantifiziert. Getestet wurden Wells mit alleiniger HPMC-Schicht (HPMC), jene mit HPMC-Schicht und unmarkierten OCC [HPMC + OCC (-GFP)] sowie Wells mit HPMC-Schicht und markierten OCC [HPMC + OCC (+GFP)].

Um ein deutlicheres Signal der Zellen unterhalb der Porenmembran zu erhalten, wurden zusätzlich die markierten OCC, die sich noch im oberen Kompartiment – größtenteils oberhalb der HPMC-Schicht – befinden, entfernt.

Mittels konfokalen Mikroskops konnte zudem die Höhe der Aufnahmen zur Quantifizierung festgelegt werden, wobei man sich hier an der deutlich sichtbaren Porenmembran orientieren konnte (**Abb. 18A**).

Abschließend werden also nur OCC quantifiziert, die zu Beginn des Assays mit Zelltracker markiert wurden und im Laufe des Assays submesothelial invadiert sind (**Abb. 18B**).

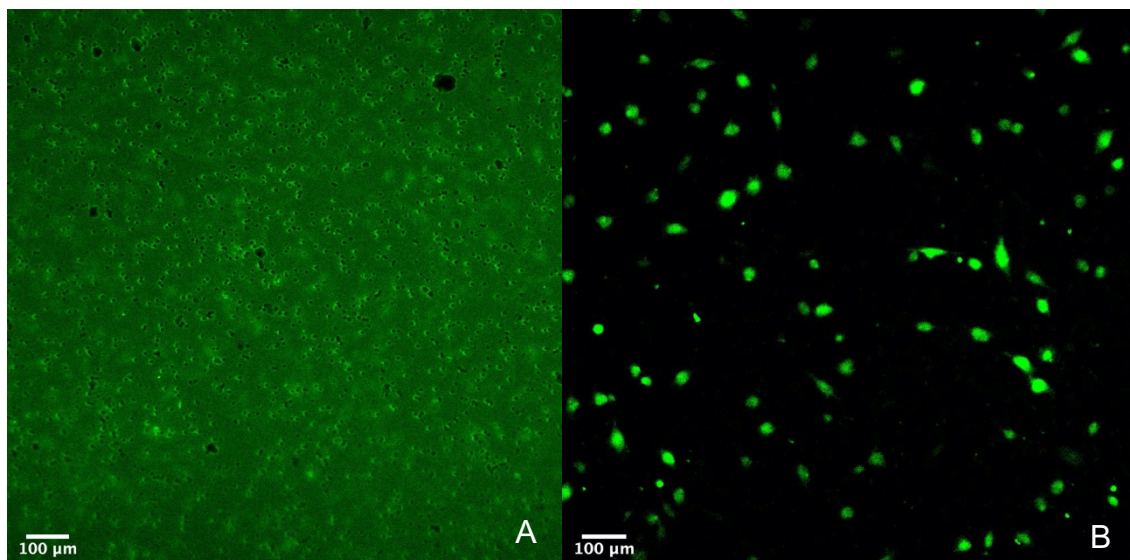


Abb. 18. Membran der Invasions-Wells und markierte OCC

Porenmembran eines Wells der für die Invasions-Assays genutzten 96-Well-Platte (**A**) sowie final quantifizierte OCC (OC_91) unterhalb der Porenmembran (**B**).

4.1.2.2 Evidenz für Chemoattraktantien ist reproduzierbar

Da man nun davon ausgehen konnte, dass nur die OCC quantifiziert wurden, die sowohl die Mesothelzellschicht als auch die Kollagen-Schicht durchdringen konnten, wurden anfangs bereits evidente Ergebnisse bezüglich der chemoattraktiven sowie stimulatorischen Wirkung bestimmter Stoffe (Aszites, FCS) mit dem neuartigen Modell respektive den primären OCC reproduziert. Für die Dauer der Migrations- bzw. Invasions-Assays wurde serum-freies OCMI-Medium mit 50% Aszites bzw. 5% FCS entweder in das OK, UK oder gleichermaßen in beide Kompartimente gegeben.

Die OCC zeigten, verglichen mit etablierten OC-Zell-Linien, ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die chemoattraktive Wirkung von FCS & Aszites; sowohl im Migrations- als auch im Invasionsassay, wo oberes und unteres Kompartiment durch eine kontinuierliche Epithelschicht mit tight-junctions voneinander getrennt sind.

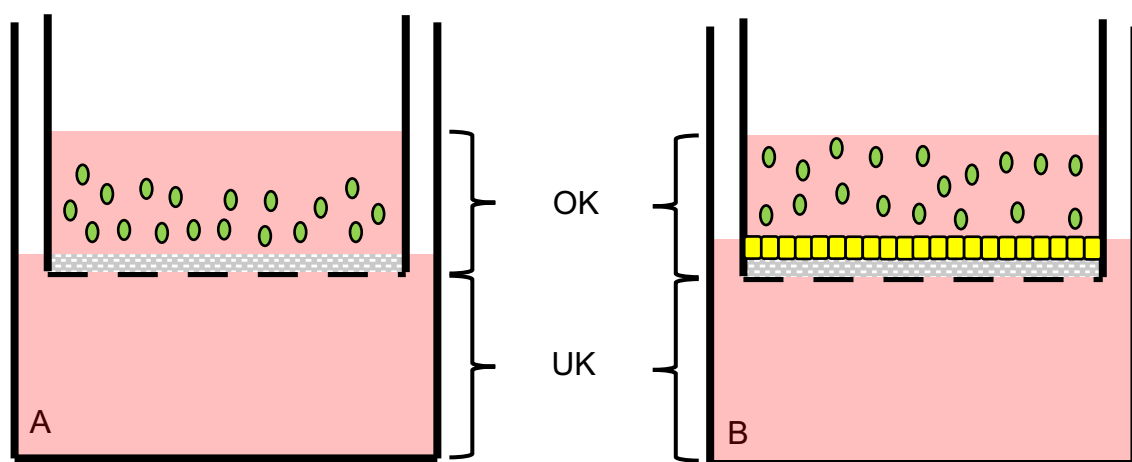


Abb. 19. Schematischer Aufbau des Migrations- (A) und Invasionsassays (B)

Die mit Zelltracker markierten OCC (Grün) werden in das OK gegeben, das durch eine Porenmembran mit Kollagen-I-Beschichtung (grau) vom UK getrennt ist. Beim Invasionsassay liegt der Kollagen-Schicht zusätzlich ein einschichtiges HPMC-Epithel (gelb) auf. OCMI-Medium (rot).

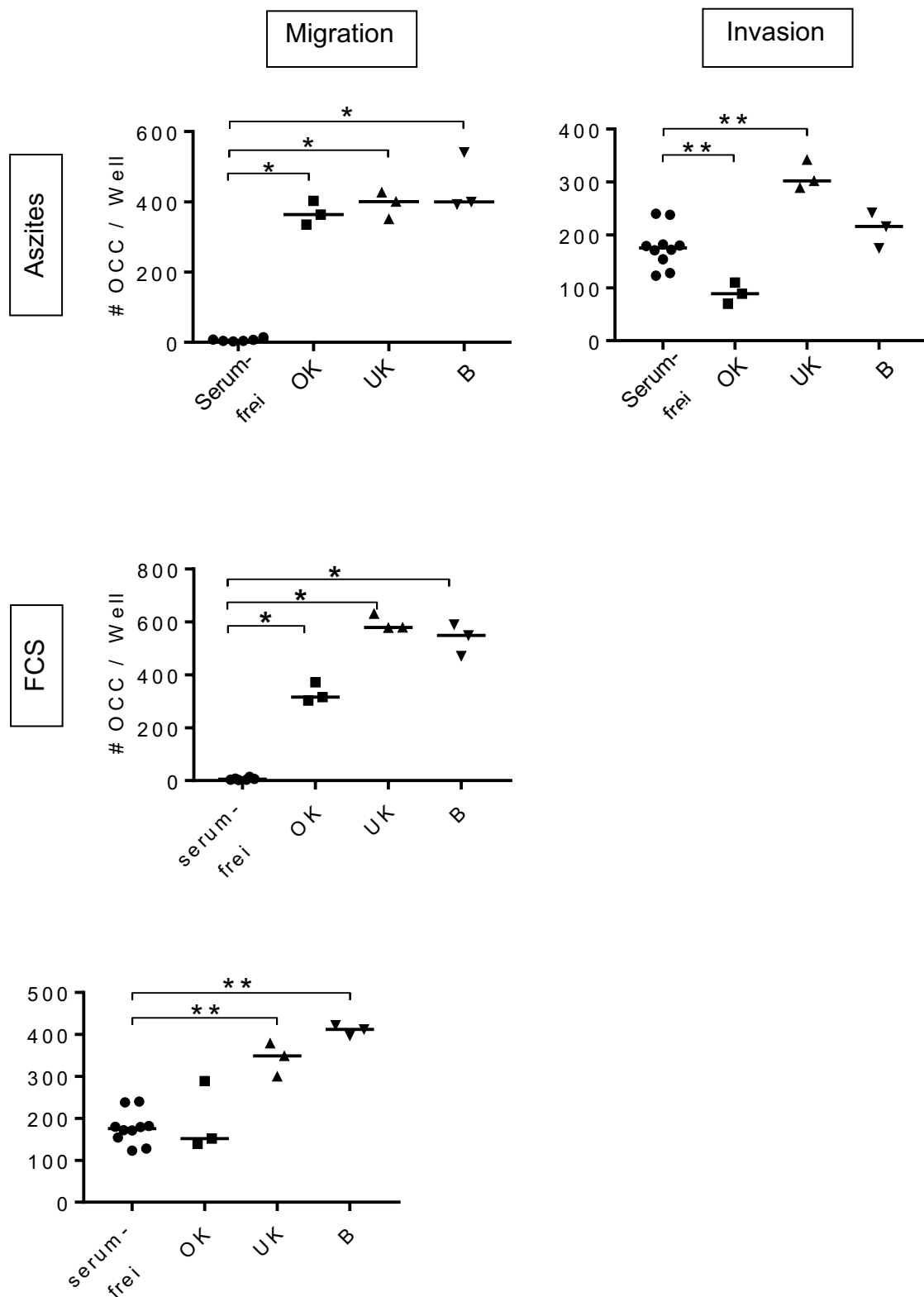


Abb. 20. Aszites und FCS als Chemoattraktantien im Migrations- und Invasionsassay

Die chemoattraktive Wirkung von Aszites (50%) und FCS (5%) in serum-freiem Kulturmedium wurde sowohl im Migrations- als auch im Invasionsassay untersucht. Aszites bzw. FCS wurden in den genannten Konzentrationen in das serum-freie Medium des oberen (OK), unteren (UK) oder in beide Kompartimente (B) der Wells

4.2 Pro-invasiver Einfluss des Mesothels

Als Negativ-Kontrolle wurde serum-freies OCMI-Medium im UK genutzt. In den serum-freien Kontrollgruppen war auffallend, dass bei gleichen Testbedingungen im Invasionsassay signifikant mehr OCC invadieren, als im Migrationsassay migrieren.

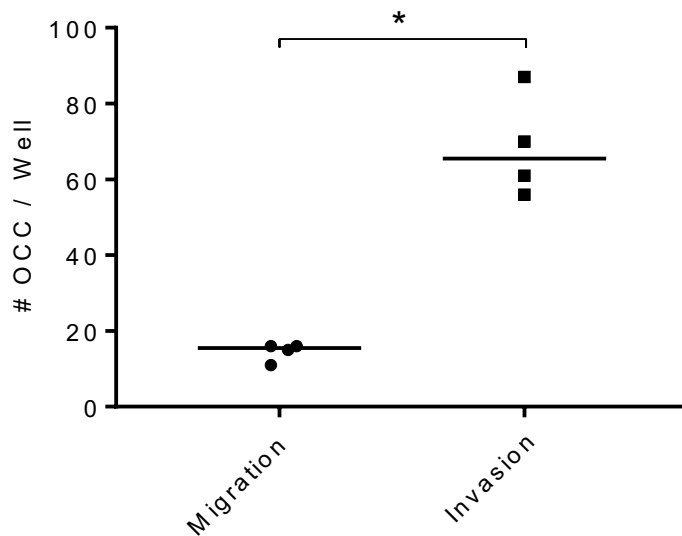


Abb. 21. Migration und Invasion ohne Stimuli und Attraktantien

Migration und Invasion der OCC (OC_91) wurden in serum-freien Medium nach 48h ohne den Einfluss von Chemoattraktantien und Stimuli gemessen.

4.2.1 Mesothel sezerniert pro-migratorische Faktoren

Zur Unterscheidung, ob zelluläre Interaktionen, lösliche Komponenten oder die Kombination beider ursächlich für die gesteigerte Invasion sind, wurde der Einfluss von CM (siehe Methodik) auf die Migration der OCC getestet.

Es zeigte sich, dass bereits nur mit CM im OK signifikant mehr OCC migrieren, als in serum-freiem Medium ohne HPMC-Epithelschicht.

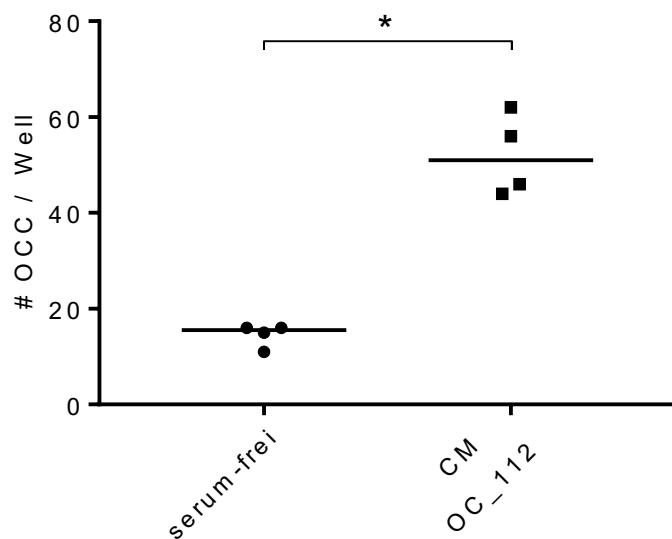


Abb. 22. Migration mit CM der Patientin OC_112 als Stimulus im OK

CM der Patientin OC_112 wurde zu den OCC (OC_91) in das OK hinzugegeben, und die Anzahl an OCC, die nach 48h in das UK migrierten, wurde bestimmt.

4.2.2 Gesteigerte Migration ist konzentrationsabhängig und patientenunabhängig

Dass die gesteigerte Migration durch CM keine patientenspezifische Besonderheit war zeigte der Vergleich von CM von verschiedenen Patientinnen.

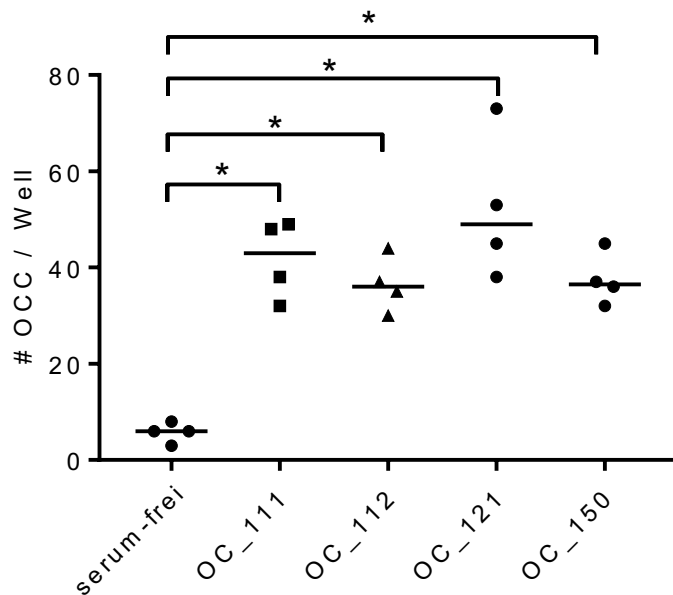


Abb. 23. Migration der OCC in CM verschiedener Patientinnen

Verglichen wurde die Anzahl migrierter OCC (OC_91) 48h unter dem Einfluss von CM verschiedener Patientinnen (OC_111, OC_112, OC_121 und OC_150).

Ebenfalls konnte mit CM ein konzentrationsabhängiger Stimulationseffekt erzielt werden, hinweisend auf lösliche Faktoren mit pro-migratorischen Effekten auf OCC.

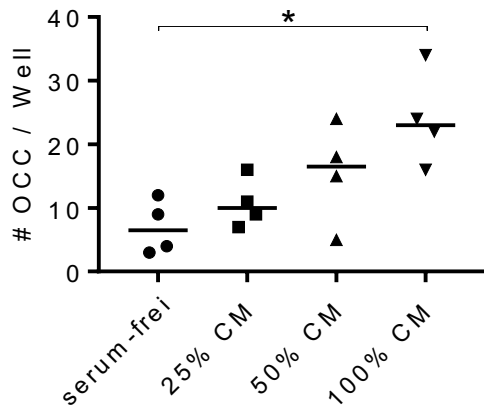


Abb. 24. Einfluss der CM-Konzentration auf die Migration (OC_37)

CM der Patientin OC_112 wurde in linear gestaffelten Konzentrationen zu den OCC im OK hinzugegeben. Der Effekt auf die Migration der OCC (OC_37) wurde nach 24h gemessen.

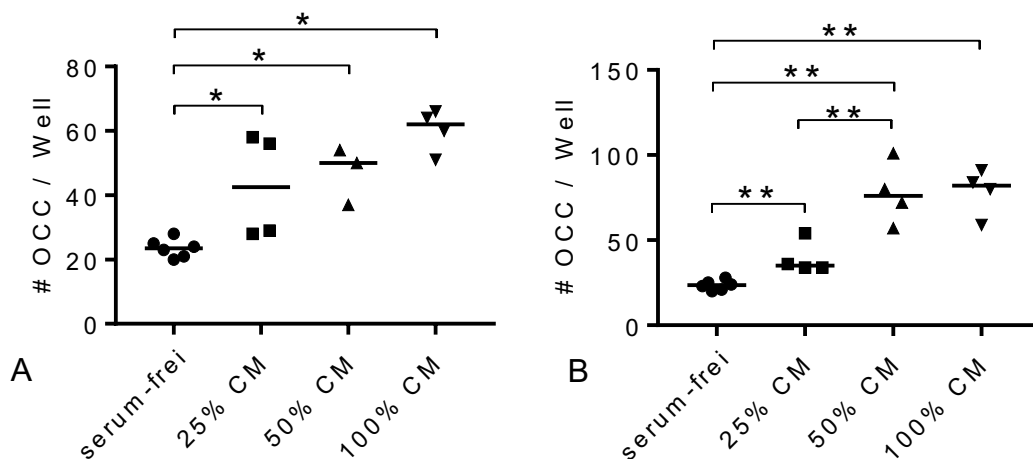


Abb. 25. Einfluss der CM-Konzentration auf die Migration (OC_91)

CM der Patientin OC_111 (A) und OC_112 (B) wurde in gestaffelten Konzentrationen zu den OCC im OK hinzugegeben. Der Effekt auf die Migration der OCC (OC_91) wurde nach 48h gemessen.

Zusammenfassend besteht also ein konzentrationsabhängiger, patientenunabhängiger pro-migratorischer Effekt des CM, der von den HPMC-sezernierte lösliche Faktoren als Ursache nahelegt.

4.3 LPA

LPA als alleinige Stimuli während der Assays zeigten in dem Setting des durchgeführten Versuches keinen Effekt auf die Adhäsion am Mesothel, daher wurde zukünftig eine Vor-Inkubation der OCC für mindestens 20h mit den LPA in angegebener Konzentration durchgeführt.

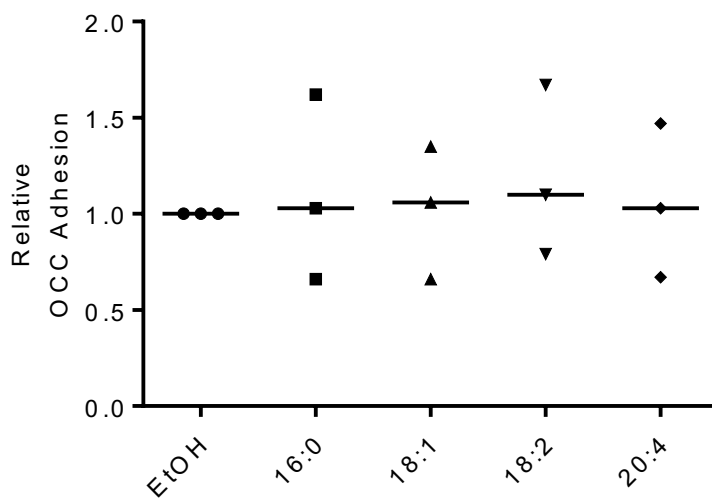


Abb. 26. Ohne Vor-Inkubation kein Einfluss der LPA auf Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht

OCC (OC_37) wurden in serum-freiem OCMI-Medium und LPA (16:0, 18:1, 18:2 und 20:4; jeweils 5µM, EtOH 1‰) auf eine kontinuierliche HPMC-Schicht gegeben. Nach einer Stunde wurden die adhärenierten OCC quantifiziert.

4.3.1 LPA steigern die Tumorzelladhäsion

Im Adhäsionsassay zeigten OC_37 bei Vor-Inkubation mit den LPA 16:0, 18:1, 18:2 und 20:4 eine um bis zu 50% gesteigerte Adhäsion am Mesothel. Bei OC_91 ließ sich dieser Effekt nicht reproduzieren.

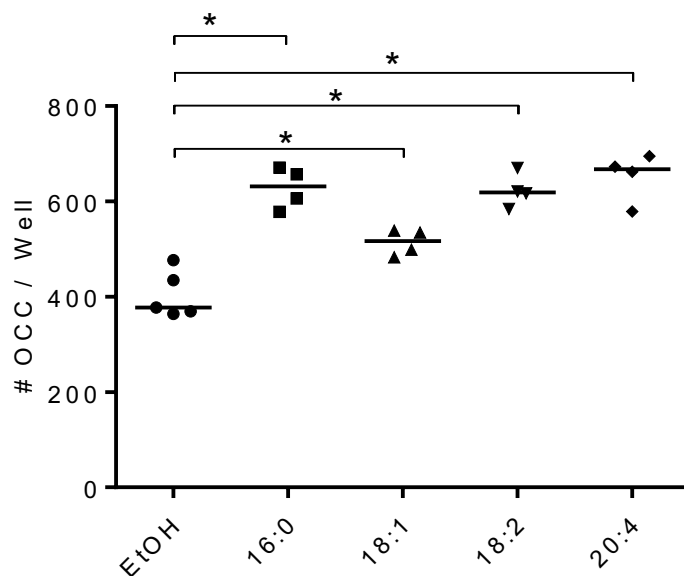


Abb. 27. Adhäsion der OCC an HPMC-Schicht nach Vor-Inkubation mit LPA

OCC (OC_37) wurden nach >20h Vor-Inkubation in serum-freiem OCMI-Medium und LPA (16:0, 18:1, 18:2 und 20:4; jeweils 5 μ M, EtOH 1‰) auf eine kontinuierliche HPMC-Schicht gegeben. Nach einer Stunde wurden die adhärten OCC quantifiziert.

Der Versuch wurde mit ähnlichen Ergebnissen 2x wiederholt.

4.3.2 LPA reduzieren die Invasivität

Zur Erörterung der Frage, ob eine gesteigerte Adhäsion unmittelbar mit einer gesteigerten Invasion einhergeht, wurde der Effekt der LPA auf die Invasion der OCC ebenfalls analysiert.

Hier fiel auf, dass LPA als Stimulantien keine pro-invasiven, sondern vielmehr anti-invasive Effekte zeigen.

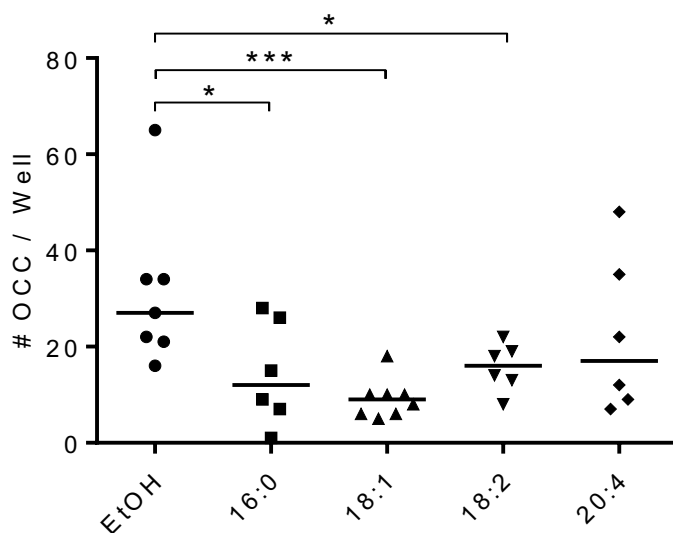


Abb. 28. Invasion unter Einfluss von LPA im OK

OCC (OC_37) wurden nach >20h Vor-Inkubation in serum-freiem OCMI-Medium und LPA (16:0, 18:1, 18:2 und 20:4; LPA in 5µM, EtOH 1‰) auf eine kontinuierliche HPMC-Schicht der Invasions-Wells gegeben. Nach 24h wurden die invadierten OCC quantifiziert.

5. Diskussion

5.1 Der neuartige 3D-Invasionsassay

5.1.1 Stärken und Schwächen im Vergleich

Das detaillierte Verständnis der peritonealen Metastasierung stellt einen wichtigen Schlüsselpunkt bei potenziellen Früherkennungsmöglichkeiten sowie der Therapie des HGSOc dar. Insbesondere zur Verlängerung des rezidivfreien Intervalls sind Verfahren wie beispielsweise die hypertherme intraperitoneale Applikation von Cisplatin von großem klinischem Erfolg (Van Driel et al., 2018), da durch diese eine signifikante Reduktion der peritonealen Metastasierung erreicht werden kann.

Wenngleich Versuche zur Metastasierung in Mäusen heutzutage einen großen präklinischen Stellenwert haben, besteht oftmals eine relativ große Diskrepanz bezüglich der Wirksamkeit im Maus-Modell und der späteren klinischen Wirksamkeit bei Menschen (Morton et al., 2016). Hierbei spielt die histologische Ähnlichkeit des Zielgewebes zur funktionellen Analyse des TME respektive der Interaktion von Tumor- und Zielgewebszellen eine entscheidende Rolle.

Peritoneum und Omentum der Maus unterscheiden sich – abgesehen von Größendimensionen - nicht wesentlich von denen des Menschen (Wilkosz et al., 2005), die Durchführbarkeit ist jedoch bei in-vitro Assays deutlich erleichtert, weshalb sie heutzutage häufig durchgeführt werden.

Um die in-vivo Situation möglichst optimal in-vitro abzubilden, sind die Bestandteile der ECM (z.B. Kollagen I sowie von HPMC sezernierte Bestandteile) sowie die Zelltypen des TME (HPMC, Adipozyten und tumorassoziierte Immunzellen) von großer funktioneller Bedeutung, da insbesondere Zell-Zell-Interaktionen eine wesentliche Rolle bei der Adhäsion und Invasion der OCC spielen (Worzfeld et al., 2017) und in etablierten Assays bisher wenig bis keine Berücksichtigung finden (Kenny et al., 2007).

Betrachtet man die grundlegende Methodik bisher publizierter in-vitro Assays, so zeigen sich große Unterschiede hinsichtlich deren Aufbau. Anfänglich durchgeführte Assays untersuchen die Adhäsion der OCC an einer Kollagen-Schicht (Barbolina et al., 2007) sowie die Adhäsion direkt an einer HPMC-Epithelschicht (Suzuki et al., 2004).

Zur genaueren funktionellen Analyse der OCC-Invasion entwickelten Niedbala et al. ein in-vitro Modell, in dem die submesotheliale ECM von bovinen Kornealzellen sezerniert wird (Niedbala et al., 1985); anderen Arbeitsgruppen gelang es sogar, humane Fibroblasten in-vitro zum submesothelialen Stroma hinzuzufügen (Kenny et al., 2008; K. Sawada et al., 2008).

Dieser neuartige Invasionsassay wird mit der Abbildung der dreidimensionalen Histologie des Peritoneums (Kultivieren der HPMC auf einer Kollagen-I-Matrix bis zur Ausbildung eines kontinuierlichen einschichtigen Epithels) eine gute Grundlage zur in-vitro Abbildung darstellen.

In zukünftigen Experimenten bietet sich so etwa die Möglichkeit, submesothelial Fibroblasten und Adipozyten zu kultivieren sowie tumorassoziierte Immunzellen in oberes und unteres Kompartiment integrieren zu können, um genaueres Verständnis über deren Einfluss auf die OCC-Invasion zu erlangen.

Ein weiterer Vorteil gegenüber den oben genannten Assays liegt in den räumlich und funktionell getrennten Kompartimenten des neuartigen Versuchsaufbaus. Betrachtet man die Art und Weise der Wirkung von Stoffen verschiedenster Art, so lassen sich - trivial dargestellt - zwei Wirkmechanismen unterscheiden: zum einen die chemoattraktive, zum anderen die direkt-stimulierende Wirkung auf OCC. Während Substanzen wie FCS (Bagati et al., 2015), Vitronectin (Schneider et al., 2016) oder auch LPA (Reinartz et al., 2019) Chemotaxis in Richtung der applizierten Testsubstanz induzieren, steigern andere die EMT, die Zell-Proliferation oder induzieren Chemotherapie-Resistenzen über intrazelluläre Signalwege ohne chemoattraktive Wirkung (Browning et al., 2018; Zhu et al., 2019).

Der durchgeführte FITC-Dextran Assay (siehe Abb. 16) legt eine funktionelle Separierung der beiden Kompartimente nahe, was zusätzlich durch die separat getestete chemoattraktive bzw. pro-invasive Wirkung von FCS und Aszites (siehe Abb. 20) bestätigt werden konnte. So kann zukünftig genauer differenziert werden, ob Substanzen, die Teil des malignen Aszites sind, etwa generell die Zellproliferation oder Invasion der OCC steigern, oder ob Bestandteile des submesothelialen Stromas an bestimmten Stellen Chemotaxis induzieren und so zu gesteigerter OCC-Adhäsion und -Invasion führen.

Während der anfänglichen Test-Durchläufe des Assays war auffallend, dass die Zellen des OK hauptsächlich das OCMI-Medium des OK verstoffwechseln, was

zwangsläufig zu einem chemoattraktiven Gefälle in Richtung des UK respektive den dort in höheren Konzentrationen vorliegenden Substraten des Kulturmediums führte. Da insbesondere das FCS eine starke chemoattraktive Wirkung auf OCC hat, wurde für die Dauer der Assays serum-freies OCMI-Medium genutzt, um diesen Effekt zu nivellieren.

Neben der histologischen Abbildung der peritonealen Wandschichtung spielen OCC die zentrale Rolle in nahezu jedem in-vitro Versuch zur peritonealen Metastasierung. Weil die Extraktion und Kultivierung von Primärzellen aus malignem Aszites von an HGSOE erkrankten Patientinnen eine große Herausforderung darstellt, greifen viele Arbeitsgruppen auf nahezu ubiquitär verfügbare Zelllinien zurück. Die am häufigsten genutzten Zelllinien SKOV3 (Kenny et al., 2007, 2008, 2009; Lessan et al., 1999), RMUG-S/-L (Nakamura et al., 2017; Papp et al., 2018) sowie HEYA8 (Kenny et al., 2008) repräsentieren nach genetisch vergleichenden Analysen jedoch nicht die in-vivo am häufigsten vorkommende histopathologische Tumorentität (Domcke et al., 2013). Da im klinischen Alltag bei über 80% der Patientinnen mit OC ein HGSOE vorliegt (Colombo et al., 2010), spielt eben genau dieser histopathologische Subtyp die wichtigste Rolle für die Entwicklung evidenzbasierter Therapiemöglichkeiten. Aus diesem Grund freue ich mich besonders, in Zusammenarbeit mit der AG Reinartz der Philipps-Universität Marburg direkt an diesen HGSOE-Primärzellen forschen zu können, um die in-vivo Situation auch in dieser Hinsicht bestmöglich abbilden zu können.

Die Vorteile der Nutzung von Zelllinien sind offenkundig die leichtere Handhabbarkeit, die geringere Anfälligkeit gegenüber Veränderungen im Rahmen der Zellkulturbedingungen sowie die Möglichkeit der längerfristigen Passagierung. Im Vergleich liegt hier sicherlich ein Nachteil der von mir genutzten Primärzellen, da sowohl HPMC als auch OCC über maximal fünf Passagen kultivierbar waren, ohne phänotypische Veränderungen aufzuweisen (siehe 2.2.2 Zellkultur).

Um Veränderungen im Rahmen der Zellkultur möglichst gering zu halten und zudem den Grundstein für die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse in anderen Arbeitsgruppen zu legen, nutzte ich das OCMI-Medium für HPMC und OCC. Da OCC vergleichsweise bei Kultivierung mit gängigen Kulturmedia (DMEM, Ham's F12, RPMI) des Öfteren genetische Abweichungen zum

Primärtumor zeigen (Davidowitz et al., 2014; Duailibi et al., 2012; Ince et al., 2015), wodurch die klinische Aussagekraft dieser Experimente in Frage gestellt werden muss, liegt die genetische Stabilität im LOH-Profil bei Kultivierung mit OCMI-Medium bei über 95% (Ince et al., 2015).

Dies weist darauf hin, dass sich die Wirksamkeit in-vitro getesteter Reagenzien ebenfalls in-vivo reproduzieren ließe.

Ambivalent zu beurteilen ist die von Grund auf hohe Varianz bei in-vitro Experimenten mit Primärzellen. Auf der einen Seite führt eine hohe genetische Varianz unweigerlich zu einer erhöhten Standardabweichung bei den Ergebnissen der Assays; ich entschied mich daher grundsätzlich für die Darstellung der Mediane und gegen den arithmetischen Mittelwert.

Auf der anderen Seite liegt bei in-vivo Tumoren nahezu regelmäßig eben genau diese hohe genetische Varianz vor, wodurch signifikante Ergebnisse für eine bessere in-vivo Reproduzierbarkeit sprechen können.

5.1.2 Potentielle zukünftige Anwendungsgebiete

Zusammengefasst liefert dieser neuartiger Metastasierungsassay eine gute Ausgangsposition für zukünftige Assays, insbes. in Bezug auf das detailliertere Verständnis der Zell-Zell-Interaktionen verschiedenster Zelltypen des TME. So steht heute außer Frage, dass Interleukine sowie inflammatorische Lipide nicht nur direkten Einfluss auf die OCC haben, sondern auch durch die Ausschüttung von tumorprogressiven und invasionsfördernden Botenstoffen (TGF-beta, IL-6 und S100) via TAM Einfluss nehmen (Worzfeld et al., 2017). Ähnliche Wirkweisen werden auch für tumorassoziierte Adipozyten und deren Sekretion von wachstumsfördernden Zytokinen (TNF-a, IL-6, TGF-b, VEGF) sowie Exosomen diskutiert (Booth et al., 2015; Cozzo et al., 2017). Zusammen mit den funktionell getrennten Kompartimenten sowie der für viele Ovarialkarzinom-Primärzellen geeigneten Methodik können OCC-Invasion und zelluläre Interaktionen des TME zukünftig noch detaillierter und näher an der in-vivo Situation erforscht und genauer verstanden werden.

5.2 Pro-invasiver Einfluss des Mesothels

5.2.1 Gesteigerte Invasivität statt Barrierefunktion

Obwohl die Adhäsion der OCC an einer HPMC-Epithelschicht, verglichen mit der Adhäsion an der ECM sowie deren singulären Bestandteilen (z.B. Kollagen-I), reduziert ist (Burleson et al., 2004; Kipps et al., 2013), konnte ich zeigen, dass signifikant mehr OCC die HPMC-Epithelschicht invadieren, als dies bei alleiniger Kollagen-I Beschichtung der Fall ist. Diese Ergebnisse stehen konträr zu denen von Kenny et al., die in ihren Versuchen eine signifikante Reduktion der Invasion durch Kollagen-I durch Mesothelzellen sowie deren konditioniertes Medium erzielten (Kenny et al., 2007). In aktueller Literatur finden sich jedoch mannigfaltig Belege, dass HPMC – summa summarum - mitnichten eine Barrierefunktion gegenüber den OCC haben, sondern vielmehr noch eine pro-invasive Rolle einnehmen. Dies geschieht z.B. durch Hochregulation der Sekretion von CD44 und Hyaluronsäure, welche beide die Zell-Zell-Adhäsion von OCC an HPMC vermitteln (Lessan et al., 1999), die HPMC-vermittelte Induktion der MMP2-Sekretion in OCC (Kenny et al., 2008), die durch OCC gesteigerte Fibronectin-Expression via TGF- β (Kenny et al., 2014) sowie gesteigerte Motilität und Invasivität durch miRNA-Downregulation (Mitra et al., 2015) oder Hochregulation von Adhäsionskinasen (FAK-Upregulation via ETS1 in OCC) (Tomar et al., 2018).

5.2.2 Lösliche Faktoren hauptursächlich für gesteigerte Invasivität

Durch Testung des konditionierten Mediums der HPMC konnte gezeigt werden, dass von HPMC sezernierte lösliche Faktoren einen patientenunabhängigen, konzentrationsabhängigen pro-invasiven Einfluss auf OCC haben.

Rieppi et al. adressierten Fibronectin als hierfür wichtigsten löslichen Faktor im malignen Aszites (Rieppi et al., 1999), während andere Arbeitsgruppen hierfür Wachstumsfaktoren (VEGF (Byrne et al., 2003)) sowie Interleukine (IL-6, IL-10, LIF sowie TGF- β) verantwortlich machen (Browning et al., 2018; Duluc et al., 2007).

Mehrfach wurde bereits gezeigt, dass die Konzentration von LPA bei Patientinnen mit HGSOc im Vergleich zu gesunden Patientinnen erhöht ist und

dass erhöhte LPA-Level mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Reinartz et al., 2019; Sutphen et al., 2004; Xiao et al., 2001; Y Xu et al., 1995; Yan Xu, 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass LPA konstitutiv von den HPMC synthetisiert werden (Ren et al., 2006). Für die direkte pro-invasive Wirkung der LPA auf OCC existieren verschiedene Erklärungsansätze, die von Steigerung der Zellproliferation (Fang et al., 2006) über die Dysinhibition von MMP (Sengupta et al., 2007) bis hin zur Induktion von EMT (Burkhalter et al., 2015; Ray et al., 2017) reichen. Auf der anderen Seite konnte die chemoattraktive Wirkung der LPA auf OCC als potentieller Wirkmechanismus gezeigt werden (Reinartz et al., 2019; Said et al., 2007).

Ich konnte eine bis zu 50% gesteigerte Tumorzelladhäsion an HPMC nach Stimulation der OCC mit LPA nachweisen, was in ähnlicher Manier bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (Ren et al., 2006; Kenjiro Sawada et al., 2002). Interessanterweise zeigte sich jedoch eine reduzierte Invasion unter dem Einfluss der LPA als Stimulus für die OCC, was mich zu der Annahme bringt, dass die OCC-Motilität in Richtung der höheren LPA-Konzentration eine größere Rolle einzunehmen scheint als die direkt pro-invasiven Wirkweisen der LPA auf OCC. Die Gewichtung dieser beider Wirkweisen lässt sich in zukünftigen Experimenten in den funktionell getrennten Kompartimenten des Invasionsassays detaillierter verstehen.

5.2.3 LPA als Mediator in der Tumormikroumgebung

Während also die Schlüsselrolle der LPA bei der Metastasierung der OCC nach wie vor umstritten bleibt und ein Zusammenspiel vieler verschiedener Wirkweisen wahrscheinlicher erscheint, zeigt sich zunehmend Evidenz für die pro-invasive Wirkung über andere Zelltypen des TME als Erklärungsansatz für die schlechte Prognose der Ovarialkarzinom-Patientinnen mit erhöhten LPA-Leveln.

So sind TAM neben HPMC im TME nicht nur wichtige LPA-Produzenten (Reinartz et al., 2019), sondern exprimieren ebenfalls LPAR, induzieren z.B. bei Mammakarzinomzellen die Invasion weiterer TAM und schaffen lokal ein tumorförderndes Mikromilieu (Cha & Koo, 2019). Ebenso konnten für LPA repulsive Effekte auf zytotoxische T-, natürliche Killer- und andere Anti-Tumor-

Immunzellen nachgewiesen werden, wodurch Tumorzellen die Immunevasion erleichtert wird (Lagadari et al., 2009; Lee et al., 2020).

In Assays mit Mammakarzinomzellen zeigte sich zudem eine Korrelation von LPA-Leveln und Lymphknotenmetastasen sowie damit einhergehend schlechterer Prognose; hier konnte eine durch TAA-induzierte Hochregulation der LPAR der Tumorzellen nachgewiesen werden (Cha & Koo, 2019).

Die detaillierten Signalwege und Wirkweisen der LPA innerhalb des TME bleiben nach wie vor Gegenstand weiterer Studien; Hypothesen und Erklärungsansätze gibt es heute unzählige.

5.3 Ausblick

Wie schon erwähnt stehen bereits etliche Zytokine (z.B. IL-6, IL-8, TGF- β) im malignen Aszites im Fokus aktueller Forschung bezüglich der Invasivität und Metastasierung von OCC; deren Einfluss ist in diesem Invasionsassay bisher nicht näher betrachtet worden.

Während die Adhäsion der OCC an HPMC unter erhöhten LPA-Leveln gesteigert ist, zeigt sich eine reduzierte Invasion. Da von HPMC sezernierte lösliche Faktoren für die gesteigerte Invasion ursächlich erscheinen, die in diesem Invasionsassay nicht mit erhöhten LPA-Leveln erklärbar ist, wird die Analyse und Spezifizierung dieser Faktoren innerhalb des HPMC-konditionierten Mediums Bestandteil zukünftiger Studien sein.

Als wichtigen Meilenstein sehe ich im peritoneal metastasierten Krankheitsstadium eine lokal anwendbare, zielgerichtete Therapie zur Reduktion der intraperitonealen Metastasierung, wie dies mittels hyperthermer intraperitonealer Applikation von Cisplatin in größeren Zentren bereits durchgeführt wird.

Sinnvoll erscheint hierfür eine proteomische und funktionelle Analyse des konditionierten Mediums, wie sie bereits in anderen Bereichen der Tumorforschung Anwendung findet (Maarof et al., 2018).

Durch die Spezifizierung von weiteren Regulatoren der OCC-Invasion sowie das Hinzufügen von Zelltypen des TME liefert dieses Metastasierungsmodell einen optimalen Ausgangspunkt, Schlüsselprozesse der intraperitonealen Metastasierung der OCC zu identifizieren, um zukünftig zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln.

6.1 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist mit über 7000 jährlichen Neuerkrankungen und einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 40% die fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache der weiblichen Bevölkerung in Deutschland. Aufgrund initial geringer bis ausbleibender Symptomatik und fehlender geeigneter Screening-Methoden in frühen Tumorstadien werden 75% der Diagnosen erst in fortgeschrittenem Stadium bei bereits stattgefundener Metastasierung gestellt; zielgerichtete Strategien zur Detektion sowie Reduktion der peritonealen Metastasen fehlen.

Um den Prozess der peritonealen Metastasierung in-vitro bestmöglich untersuchen zu können, wurde ein neuartiger, dreidimensionaler Invasionsassay mit primären Zellen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen etabliert. In diesem Assay werden primäre humane Mesothelzellen auf kollagenbeschichteten Polycarbonatmembranen konfluent kultiviert, um den dreidimensionalen Aufbau des humanen Peritoneums abzubilden. Primäre, aus dem Aszites von Patientinnen mit hochgradig entdifferenziertem serösen Ovarialkarzinom isolierte Tumorzellen werden dann auf die Mesothelzellschicht aufgebracht; anschließend wird das Invasionsverhalten analysiert. Mit Hilfe dieses Assays konnte für verschiedene Patientinnen gezeigt werden, dass Mesothelzellen die Invasivität der Ovarialkarzinomzellen signifikant erhöhen.

Versuche mit konditioniertem Medium der Mesothelzellen zeigten, dass diese Effekte durch lösliche Faktoren vermittelt und konzentrationsabhängig sind. Lysophosphatidsäuren konnten dabei als Kandidaten für solche löslichen Faktoren ausgeschlossen werden.

Der hier neu etablierte Invasionsassay erlaubt die Analyse von entscheidenden Schritten der Metastasierung des Ovarialkarzinoms. Eine Identifikation der vom Mesothel sezernierten Moleküle, die den hier identifizierten pro-invasiven Effekt des Mesothels vermitteln, könnte in der Zukunft neuartige Ansatzpunkte für die Therapie des Ovarialkarzinoms bringen.

6.2 Summary

Ovarian cancer, which affects more than 7000 women in Germany every year, has an average 5-year-survival rate of only 40% and is thus one of the most lethal cancers among females. The lack of successful screening parameters plus the fact that women initially do not suffer from symptoms lead to a late initial diagnosis with advanced stages in 75% of patients. Currently, physicians still lack a proper diagnostic approach to detect peritoneal metastasis and targeted therapies are still desperately needed.

This novel three-dimensional invasion-assay on primary ovarian cancer cells enables a better in-vitro model for future analysis of peritoneal metastasis.

To reproduce the three-dimensional structure of the peritoneal wall human primary mesothelial cells were cultured on polycarbonate Transwells until they reached confluency. Primary ovarian cancer cells isolated from malignant ascites of women suffering from high-grade serous ovarian cancer were placed above this mesothelial monolayer to further analyze their invasion.

Thereby, we were able to identify mesothelial cells as significant promoters of ovarian cancer cell invasion. After incubation with conditioned medium of human mesothelial cells more cancer cell invasion was seen, which points to a possible enhancing role of soluble factors in the invasion process. Those effects could be reproduced in different patients and in a concentration dependent manner.

Relevant effects of Lysophosphatidic acids could be excluded performing invasion-assays with lysophosphatidic acids only.

This novel invasion-assay thus holds great potential to further investigate key processes of peritoneal metastasis in ovarian cancer. The identification of soluble factors secreted by mesothelial cells as a promotor of ovarian cancer invasion might provide a possible target for therapeutic approaches in patients suffering from ovarian cancer in the future.

7. Literaturverzeichnis

AWMF. (o. J.). *S3-Leitlinie Maligne Ovarialtumoren 2019*

Bagati, A., Koch, Z., Bofinger, D., Goli, H., Weiss, L. S., Dau, R., Thomas, M., & Zucker, S. N. (2015). A Modified In vitro Invasion Assay to Determine the Potential Role of Hormones, Cytokines and/or Growth Factors in Mediating Cancer Cell Invasion. *Journal of Visualized Experiments*, 98, 51480. <https://doi.org/10.3791/51480>

Barbolina, M. V., Adley, B. P., Ariztia, E. V., Liu, Y., & Stack, M. S. (2007). Microenvironmental Regulation of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Activity in Ovarian Carcinoma Cells via Collagen-induced EGR1 Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4924–4931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608428200>

Bian, D., Su, S., Mahanivong, C., Cheng, R. K., Han, Q., Pan, Z. K., Sun, P., & Huang, S. (2004). Lysophosphatidic Acid Stimulates Ovarian Cancer Cell Migration via a Ras-MEK Kinase 1 Pathway. *Cancer Research*, 64(12), 4209–4217. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0060>

Booth, A., Magnuson, A., Fouts, J., & Foster, M. (2015). Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 21(1). <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0037>

Browning, L., Patel, M., Bring Horvath, E., Tawara, K., & Jorcyk, C. L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: Inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Management and Research*, Volume 10, 6685–6693. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S179189>

- Burkhalter, R. J., Westfall, S. D., Liu, Y., & Stack, M. S. (2015). Lysophosphatidic Acid Initiates Epithelial to Mesenchymal Transition and Induces β -Catenin-mediated Transcription in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 290(36), 22143–22154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.641092>
- Burleson, K. M., Casey, R. C., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, T. R., & Skubitz, A. P. N. (2004). Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecologic Oncology*, 93(1), 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.12.034>
- Buy, S. S. (2011). Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 305(22), 2295. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.766>
- Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L., Hofmann, J. I., Yancopoulos, G. D., & Jaffe, R. B. (2003). Vascular Endothelial Growth Factor-Trap Decreases Tumor Burden, Inhibits Ascites, and Causes Dramatic Vascular Remodeling in an Ovarian Cancer Model. *Clinical Cancer Research*, 9, 5721–5728
- Casey, R. C., Burleson, K. M., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, T. R., Ruff, L. E., & Skubitz, A. P. N. (2001). Beta-1-Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids. *American Journal of Pathology*, 159(6)

- Cha, Y. J., & Koo, J. S. (2019). Expression of Autotaxin–Lysophosphatidate Signaling-Related Proteins in Breast Cancer with Adipose Stroma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2102. <https://doi.org/10.3390/ijms20092102>
- Colombo, N., Peiretti, M., Parma, G., Lapresa, M., Mancari, R., Carinelli, S., Sessa, C., Castiglione, M., & On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. (2010). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq244>
- Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.-M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.-L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>
- Cozzo, A. J., Fuller, A. M., & Makowski, L. (2017). Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer. In D. M. Pollock (Hrsg.), *Comprehensive Physiology* (S. 237–282). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170008>
- Daraï, E., Scoazec, J.-Y., Walker-Combrouze, F., Mlika-Cabanne, N., Feldmann, G., Madelenat, P., & Potet, F. (1997). Expression of cadherins in benign, borderline, and malignant ovarian epithelial tumors: A clinicopathologic study of 60 cases. *Human Pathology*, 28(8), 922–928. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(97\)90007-1](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(97)90007-1)

- Davidowitz, R. A., Selfors, L. M., Iwanicki, M. P., Elias, K. M., Karst, A., Piao, H., Ince, T. A., Drage, M. G., Dering, J., Konecny, G. E., Matulonis, U., Mills, G. B., Slamon, D. J., Drapkin, R., & Brugge, J. S. (2014). Mesenchymal gene program—expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance. *Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2611–2625. <https://doi.org/10.1172/JCI69815>
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature Communications*, 4(1), 2126. <https://doi.org/10.1038/ncomms3126>
- Duailibi, M. T., Kulikowski, L. D., Duailibi, S. E., Lipay, M. V. N., Melaragno, M. I., Ferreira, L. M., Vacanti, J. P., & Yelick, P. C. (2012). Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *Journal of Molecular Histology*, 43(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s10735-011-9373-z>
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., Descamps, P., Gamelin, E., Gascan, H., Hebbar, M., & Jeannin, P. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, 110(13), 4319–4330. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-072587>
- Fang, X., Gaudette, D., Furui, T., Mao, M., Estrella, V., Eder, A., Pustilnik, T., Sasagawa, T., Lapushin, R., Yu, S., Jaffe, R. B., Wiener, J. R., Erickson, J. R., & Mills, G. B. (2006). Lysophospholipid Growth Factors in the Initiation, Progression, Metastases, and Management of Ovarian Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905(1), 188–208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06550.x>

- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: The „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458.
<https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Fishman, D. A., Liu, Y., Ellerbroek, S. M., & Stack, M. S. (2001). Lysophosphatidic Acid Promotes Matrix Metalloproteinase (MMP) Activation and MMP-dependent Invasion in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 61, 3194–3199
- Gardner, M. J., Catterall, J. B., Jones, L. M. H., & Turner, G. A. (1996). Human ovarian tumour cells can bind hyaluronic acid via membrane CD44: A possible step in peritoneal metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14(4), 325–334. <https://doi.org/10.1007/BF00123391>
- Gerber, S. A., Rybalko, V. Y., Bigelow, C. E., Lugade, A. A., Foster, T. H., Frelinger, J. G., & Lord, E. M. (2006). Preferential Attachment of Peritoneal Tumor Metastases to Omental Immune Aggregates and Possible Role of a Unique Vascular Microenvironment in Metastatic Survival and Growth. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1739–1752.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051222>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335.
<https://doi.org/10.1038/nature15756>

- Ince, T. A., Sousa, A. D., Jones, M. A., Harrell, J. C., Agoston, E. S., Krohn, M., Selfors, L. M., Liu, W., Chen, K., Yong, M., Buchwald, P., Wang, B., Hale, K. S., Cohick, E., Sergeant, P., Witt, A., Kozhekbaeva, Z., Gao, S., Agoston, A. T., ... Mills, G. B. (2015). Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nature Communications*, 6(1), 7419. <https://doi.org/10.1038/ncomms8419>
- Iwanicki, M. P., Davidowitz, R. A., Ng, M. R., Besser, A., Muranen, T., Merritt, M., Danuser, G., Ince, T., & Brugge, J. S. (2011). Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium. *Cancer Discovery*, 1(2), 144–157. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-11-0010>
- Jacobs, I. J., Menon, U., Ryan, A., Gentry-Maharaj, A., Burnell, M., Kalsi, J. K., Amso, N. N., Apostolidou, S., Benjamin, E., Cruickshank, D., Crump, D. N., Davies, S. K., Dawney, A., Dobbs, S., Fletcher, G., Ford, J., Godfrey, K., Gunu, R., Habib, M., ... Skates, S. J. (2016). Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): A randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10022), 945–956. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01224-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01224-6)
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., ... Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820–827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>

- Kenny, H. A., Chiang, C.-Y., White, E. A., Schryver, E. M., Habis, M., Romero, I. L., Ladanyi, A., Penicka, C. V., George, J., Matlin, K., Montag, A., Wroblewski, K., Yamada, S. D., Mazar, A. P., Bowtell, D., & Lengyel, E. (2014). Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4614–4628. <https://doi.org/10.1172/JCI74778>
- Kenny, H. A., Dogan, S., Zillhardt, M., K. Mitra, A., Yamada, S. D., Krausz, T., & Lengyel, E. (2009). Organotypic Models of Metastasis: A Three-dimensional Culture Mimicking the Human Peritoneum and Omentum for the Study of the Early Steps of Ovarian Cancer Metastasis. In M. S. Stack & D. A. Fishman (Hrsg.), *Ovarian Cancer* (Bd. 149, S. 335–351). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98094-2_16
- Kenny, H. A., Kaur, S., Coussens, L. M., & Lengyel, E. (2008). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1367–1379. <https://doi.org/10.1172/JCI33775>
- Kenny, H. A., Krausz, T., Yamada, S. D., & Lengyel, E. (2007). Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *International Journal of Cancer*, 121(7), 1463–1472. <https://doi.org/10.1002/ijc.22874>
- Kipps, E., Tan, D. S. P., & Kaye, S. B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: New avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 273–282. <https://doi.org/10.1038/nrc3432>

- Lagadari, M., Truta-Feles, K., Lehmann, K., Berod, L., Ziemer, M., Idzko, M., Barz, D., Kamradt, T., Maghazachi, A. A., & Norgauer, J. (2009). Lysophosphatidic acid inhibits the cytotoxic activity of NK cells: Involvement of Gs protein-mediated signaling. *International Immunology*, 21(6), 667–677. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp035>
- Landskron, J., Helland, Ø., Torgersen, K. M., Aandahl, E. M., Gjertsen, B. T., Bjørge, L., & Taskén, K. (2015). Activated regulatory and memory T-cells accumulate in malignant ascites from ovarian carcinoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(3), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1636-6>
- Lee, S. C., Dacheux, M. A., Norman, D. D., Balázs, L., Torres, R. M., Augelli-Szafran, C. E., & Tigyi, G. J. (2020). Regulation of Tumor Immunity by Lysophosphatidic Acid. *Cancers*, 12(5), 1202. <https://doi.org/10.3390/cancers12051202>
- Lengyel, E. (2010). Ovarian Cancer Development and Metastasis. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1053–1064. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100105>
- Lessan, K., Aguiar, D. J., Oegema, T., Siebenson, L., & Skubitz, A. P. N. (1999). CD44 and Beta-1 Integrin Mediate Ovarian Carcinoma Cell Adhesion to Peritoneal Mesothelial Cells. *American Journal of Pathology*, 154(5)
- Li, H., Wang, D., Zhang, H., Kirmani, K., Zhao, Z., Steinmetz, R., & Xu, Y. (2009). Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(6), 1692–1701. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1106>

- Maarof, M., Lokanathan, Y., Ruszymah, H. I., Saim, A., & Chowdhury, S. R. (2018). Proteomic Analysis of Human Dermal Fibroblast Conditioned Medium (DFCM). *The Protein Journal*, 37(6), 589–607. <https://doi.org/10.1007/s10930-018-9800-z>
- Mitra, A. K., Chiang, C. Y., Tiwari, P., Tomar, S., Watters, K. M., Peter, M. E., & Lengyel, E. (2015). Microenvironment-induced downregulation of miR-193b drives ovarian cancer metastasis. *Oncogene*, 34(48), 5923–5932. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.43>
- Morton, J. J., Bird, G., Refaeli, Y., & Jimeno, A. (2016). Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. *Cancer Research*, 76(21), 6153–6158. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1260>
- Moser, T. L., Pizzo, S. V., Bafetti, L. M., Fishman, D. A., & Stack, M. S. (1996). Evidence for preferential adhesion of ovarian epithelial carcinoma cells to type I collagen mediated by the alpha2beta1 integrin. *International Journal of Cancer*, 67, 695–701
- Nakamura, K., Sawada, K., Kinose, Y., Yoshimura, A., Toda, A., Nakatsuka, E., Hashimoto, K., Mabuchi, S., Morishige, K., Kurachi, H., Lengyel, E., & Kimura, T. (2017). Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Molecular Cancer Research*, 15(1), 78–92. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0191>
- Niedbala, M. J., Crickard, K., & Bernacki, R. J. (1985). Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. *Experimental Cell Research*, 160(2), 499–513. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90197-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90197-1)

- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Papp, E., Hallberg, D., Konecny, G. E., Bruhm, D. C., Adleff, V., Noë, M., Kagiampakis, I., Palsgrove, D., Conklin, D., Kinose, Y., White, J. R., Press, M. F., Drapkin, R., Easwaran, H., Baylin, S. B., Slamon, D., Velculescu, V. E., & Scharpf, R. B. (2018). Integrated Genomic, Epigenomic, and Expression Analyses of Ovarian Cancer Cell Lines. *Cell Reports*, 25(9), 2617–2633. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.096>
- Perets, R., Wyant, G. A., Muto, K. W., Bijron, J. G., Poole, B. B., Chin, K. T., Chen, J. Y. H., Ohman, A. W., Stepule, C. D., Kwak, S., Karst, A. M., Hirsch, M. S., Setlur, S. R., Crum, C. P., Dinulescu, D. M., & Drapkin, R. (2013). Transformation of the Fallopian Tube Secretory Epithelium Leads to High-Grade Serous Ovarian Cancer in Brca;Tp53;Pten Models. *Cancer Cell*, 24(6), 751–765. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.10.013>
- Preston, C. C., Maurer, M. J., Oberg, A. L., Visscher, D. W., Kalli, K. R., Goode, E. L., & Knutson, K. L. (2013). The Ratios of CD8+ T Cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLOS ONE*, 8(11)
- Ramalingam, P. (2016). Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology*, 30(2), 166–176
- Ray, U., Roy, S. S., & Chowdhury, S. R. (2017). Lysophosphatidic Acid Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cells by Repressing SIRT1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(2), 795–805. <https://doi.org/10.1159/000458744>

- Reinartz, S., Finkernagel, F., Adhikary, T., Rohnalter, V., Schumann, T., Schober, Y., Nockher, W. A., Nist, A., Stiewe, T., Jansen, J. M., Wagner, U., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2016). A transcriptome-based global map of signaling pathways in the ovarian cancer microenvironment associated with clinical outcome. *Genome Biology*, 17(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0956-6>
- Reinartz, S., Lieber, S., Pesek, J., Brandt, D. T., Asafova, A., Finkernagel, F., Watzner, B., Nockher, W. A., Nist, A., Stiewe, T., Jansen, J. M., Wagner, U., Konzer, A., Graumann, J., Grosse, R., Worzfeld, T., Müller-Brüsselbach, S., & Müller, R. (2019). Cell type-selective pathways and clinical associations of lysophosphatidic acid biosynthesis and signaling in the ovarian cancer microenvironment. *Molecular Oncology*, 13(2), 185–201. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12396>
- Ren, J., Xiao, Y., Singh, L. S., Zhao, X., Zhao, Z., Feng, L., Rose, T. M., Prestwich, G. D., & Xu, Y. (2006). Lysophosphatidic Acid Is Constitutively Produced by Human Peritoneal Mesothelial Cells and Enhances Adhesion, Migration, and Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(6), 3006–3014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1292>
- Rieppi, M., Vergani, V., Gatto, C., Zanetta, G., Allavena, P., Taraboletti, G., & Giavazzi, R. (1999). Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 80, 303–307
- Robert Koch-Institut. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. <https://doi.org/10.17886/RKIPUBL-2017-007>

- Rump, A., Morikawa, Y., Tanaka, M., Minami, S., Umesaki, N., Takeuchi, M., & Miyajima, A. (2004). Binding of Ovarian Cancer Antigen CA125/MUC16 to Mesothelin Mediates Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9190–9198. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312372200>
- Said, N. A., Najwer, I., Socha, M. J., Fulton, D. J., Mok, S. C., & Motamed, K. (2007). SPARC Inhibits LPA-Mediated Mesothelial—Ovarian Cancer Cell Crosstalk. *Neoplasia*, 9(1), 23–35. <https://doi.org/10.1593/neo.06658>
- Sawada, K., Mitra, A. K., Radjabi, A. R., Bhaskar, V., Kistner, E. O., Tretiakova, M., Jagadeeswaran, S., Montag, A., Becker, A., Kenny, H. A., Peter, M. E., Ramakrishnan, V., Yamada, S. D., & Lengyel, E. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via Alpha-5-Integrin, which Is a Therapeutic Target. *Cancer Research*, 68(7), 2329–2339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5167>
- Sawada, Kenjiro, Morishige, K., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K., & Murata, Y. (2002). Lysophosphatidic Acid Induces Focal Adhesion Assembly through Rho/Rho-Associated Kinase Pathway in Human Ovarian Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*, 87(3), 252–259. <https://doi.org/10.1006/gyno.2002.6831>
- Schneider, G., Suszynska, M., Kakar, S., & Ratajczak, M. Z. (2016). Vitronectin in the Ascites of Human Ovarian Carcinoma Acts as a Potent Chemoattractant for Ovarian Carcinoma: Implication for Metastasis by Cancer Stem Cells. *Journal of Cancer Stem Cell Research*, 4(5), 1. <https://doi.org/10.14343/JCSCR.2016.4e1005>

- Sengupta, S., Kim, K. S., Berk, M. P., Oates, R., Escobar, P., Belinson, J., Li, W., Lindner, D. J., Williams, B., & Xu, Y. (2007). Lysophosphatidic acid downregulates tissue inhibitor of metalloproteinases, which are negatively involved in lysophosphatidic acid-induced cell invasion. *Oncogene*, 26(20), 2894–2901. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210093>
- So, J., Navari, J., Wang, F.-Q., & Fishman, D. A. (2004). Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8. *Gynecologic Oncology*, 95(2), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.08.001>
- Stadlmann, S., Raffener, R., Amberger, A., Margreiter, R., Zeimet, A. G., Abendstein, B., Moser, P. L., Mikuz, G., Klosterhalfen, B., & Offner, F. A. (2003). Disruption of the integrity of human peritoneal mesothelium by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Virchows Archiv*, 443(5), 678–685. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0867-2>
- Strobel, T., & Cannistra, S. (1999). Beta-1-Integrins Partly Mediate Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro. *Gynecologic Oncology*, 73, 362–367
- Sutphen, R., Xu, Y., Wilbanks, G. D., Fiorica, J., Jr, E. C. G., LaPolla, J. P., Arango, H., Hoffman, M. S., Martino, M., Wakeley, K., Griffin, D., Blanco, R. W., Cantor, A. B., Xiao, Y., & Krischer, J. P. (2004). Lysophospholipids Are Potential Biomarkers of Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 1185–1191

- Suzuki, N., Aoki, D., Tamada, Y., Susumu, N., Orikawa, K., Tsukazaki, K., Sakayori, M., Suzuki, A., Fukuchi, T., Mukai, M., Kojima-Aikawa, K., Ishida, I., & Nozawa, S. (2004). HMOCC-1, a human monoclonal antibody that inhibits adhesion of ovarian cancer cells to human mesothelial cells. *Gynecologic Oncology*, 95(2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.06.024>
- Symowicz, J., Adley, B. P., Woo, M. M. M., Auersperg, N., Hudson, L. G., & Stack, M. S. (2005). Cyclooxygenase-2 Functions as a Downstream Mediator of Lysophosphatidic Acid to Promote Aggressive Behavior in Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 65(6), 2234–2242. <https://doi.org/10.1158/0008.5472.CAN-04-2781>
- Takeda, A., Umemoto, E., & Miyasaka, M. (2015). Lysophosphatidic acid as a regulator of lymphocyte trafficking in the lymph nodes. *Translational Cancer Research*, 4(5), 7
- Tan, D. S., Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2006). Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *The Lancet Oncology*, 7(11), 925–934. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70939-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70939-1)
- Tarin, D., Price, J. E., Kettlewell, M. G., Souter, R. G., Vass, A. C., & Crossley, B. (1984). Clinicopathological observations on metastasis in man studied in patients treated with peritoneovenous shunts. *BMJ*, 288(6419), 749–751. <https://doi.org/10.1136/bmj.288.6419.749>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>

- Tomar, S., Plotnik, J. P., Haley, J., Scantland, J., Dasari, S., Sheikh, Z., Emerson, R., Lenz, D., Hollenhorst, P. C., & Mitra, A. K. (2018). ETS1 induction by the microenvironment promotes ovarian cancer metastasis through focal adhesion kinase. *Cancer Letters*, 414, 190–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.012>
- Van Baal, J. O. A. M., van Noorden, C. J. F., Nieuwland, R., Van de Vijver, K. K., Sturk, A., van Driel, W. J., Kenter, G. G., & Lok, C. A. R. (2018). Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 66(2), 67–83. <https://doi.org/10.1369/0022155417742897>
- Van Driel, W. J., Koole, S. N., Sikorska, K., Schagen van Leeuwen, J. H., Schreuder, H. W. R., Hermans, R. H. M., de Hingh, I. H. J. T., van der Velden, J., Arts, H. J., Massuger, L. F. A. G., Aalbers, A. G. J., Verwaal, V. J., Kieffer, J. M., Van de Vijver, K. K., van Tinteren, H., Aaronson, N. K., & Sonke, G. S. (2018). Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 378(3), 230–240. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708618>
- Wilkosz, S., Ireland, G., Khwaja, N., Walker, M., Butt, R., Giorgio-Miller, A., & Herrick, S. E. (2005). A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anatomy and Embryology*, 209(3), 251–261. <https://doi.org/10.1007/s00429-004-0446-6>
- Worzfeld, T., Pogge von Strandmann, E., Huber, M., Adhikary, T., Wagner, U., Reinartz, S., & Müller, R. (2017). The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00024>

- Xiao, Y., Schwartz, B., Washington, M., Kennedy, A., Webster, K., Belinson, J., & Xu, Y. (2001). Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Lysophospholipids in Human Ascitic Fluids: Comparison of the Lysophospholipid Contents in Malignant vs Nonmalignant Ascitic Fluids. *Analytical Biochemistry*, 290(2), 302–313. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5000>
- Xu, Y, Fang, X. J., Casey, G., & Mills, G. B. (1995). Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochemical Journal*, 309(3), 933–940. <https://doi.org/10.1042/bj3090933>
- Xu, Yan. (1998). Lysophosphatidic Acid as a Potential Biomarker for Ovarian and Other Gynecologic Cancers. *JAMA*, 280(8), 719. <https://doi.org/10.1001/jama.280.8.719>
- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., & Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1192–1214. <https://doi.org/10.1194/jlr.R046458>
- Zentrum Für Krebsregisterdaten (ZfKD) Im Robert Koch-Institut. (2019). *Krebs in Deutschland für 2015/2016* (Version 1) [Data set]. ZfKD – German Center for Cancer Registry Data at the RKI. <https://doi.org/10.18444/5.03.01.0005.0014.0001>
- Zhou, J., Du, Y., Lu, Y., Luan, B., Xu, C., Yu, Y., & Zhao, H. (2019). CD44 Expression Predicts Prognosis of Ovarian Cancer Patients Through Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating Snail, ZEB1, and Caveolin-1. *Frontiers in Oncology*, 9, 802. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00802>

Zhu, J., Zheng, Y., Zhang, H., Liu, Y., Sun, H., & Zhang, P. (2019). Galectin-1 induces metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human ovarian cancer cells via activation of the MAPK JNK/p38 signalling pathway. *American Journal of Translational Research*, 11(6), 3862–3878

Die Genehmigungen zur Verwendung und Modifizierung der zitierten Abbildungen liegen vor und können bei Bedarf nachgereicht werden.

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

Name:	Simon Schwarz
Anschrift:	Tennenbacher Str. 50, 79106 Freiburg
Geburtsdatum-/ort:	11.03.1996 in Lörrach

Schulischer Bildungsweg

09/2006 – 05/2014	Auguste-Pattberg-Gymnasium, Mosbach
09/2002 – 07/2006	Grundschule, Aglasterhausen

Berufliche Ausbildung

12/2020 – 04/2021	Praktisches Jahr (Tertial Anästhesie) <ul style="list-style-type: none">• Universitätsklinikum Münster
09/2020 – 12/2020	Praktisches Jahr (Tertial Innere Medizin) <ul style="list-style-type: none">• Städtisches Klinikum, München
05/2020 – 09/2020	Praktisches Jahr (Tertial Chirurgie) <ul style="list-style-type: none">• Kantonsspital Sursee, Luzern (Schweiz)
04/2020	2. Staatsexamen der Humanmedizin

07/2019

Famulatur Allgemeinmedizin

- Hausarztpraxis Dres. Weritz & Brinschwitz,
Metelen

03/2019

Famulatur Innere Medizin

- Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie
Städtisches Klinikum, München

Seit 11/2017

Doktorand am Institut für Pharmakologie
der Philipps-Universität Marburg

08/2017

Famulatur Radiologie

- Universitätsklinikum Marburg

03/2017

Famulatur Chirurgie

- Chirurgisches Zentrum, Wiesloch

08/2016

1. Staatsexamen der Humanmedizin

Seit 10/2014

Studium der Humanmedizin

Philipps-Universität Marburg

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer /-innen

Prof. Dr. Detlef Bartsch
Prof. Dr. Stefan Bauer
Prof. Dr. Annette Becker
Prof. Dr. Katja Becker
Prof. Dr. Siegfried Bien
Prof. Dr. Sven Bogdan
Prof. Dr. Frank Czubayko
Dr. Barbara Fritz
Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann
Prof. Dr. Max Geraedts
Prof. Dr. Thomas Gress
Prof. Dr. Dr. Christiane Hey
Prof. Dr. Rainer Hofmann
Prof. Dr. Joachim Hoyer
Prof. Dr. Walter Werner Hundt
Dr. Andreas Jerrentrup
Prof. Dr. Doktor Peter Herbert Kann
Prof. Dr. Ralf Kinscherf
Prof. Dr. Tilo Kircher
Prof. Dr. Roland Lill
Prof. Dr. Michael Lohoff
Prof. Dr. Andreas Mahnken
Prof. Dr. Rolf Felix Maier
Prof. Dr. Andreas Neubauer
Prof. Dr. Bernhard Neumüller
Prof. Dr. Christopher Nimsky
Prof. Dr. Dominik Oliver
Dr. Egbert Opitz
Prof. Dr. Axel Frieder Pagenstecher
Dr. Christian-Dominik Peterlein
Prof. Dr. Ardawan Julian Rastan
Prof. Dr. Harald Renz

Prof. Dr. Reinald Repp
Prof. Dr. Manfred Riße
Prof. Dr. Volker Roelcke
Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
Prof. Dr. Marco Bernhard Rust
Prof. Dr. Irmtraut Sahmland
Prof. Dr. Bernhard Schieffer
Prof. Dr. Joachim Schneider
Dr. Carmen Schwee
Dr. Carola Seifert
Prof. Dr. Walter Sekundo
Dr. Bernd Stahl
Prof. Dr. Boris Stuck
Prof. Dr. Kati Thieme
Prof. Dr. Lars Timmermann
Prof. Dr. Claus Vogelmeier
Prof. Dr. Uwe Armin Georg Wagner
Dr. Reiner Westermann
Dr. Christian Wrocklage
Prof. Dr. Hinnerk Friedrich Wilhelm Wulf

8.3 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meiner Familie, die mich konsequent im Studium sowie im Freisemester unterstützt, sowie an anstrengenden Labor- und Arbeitstagen bei Laune gehalten hat.

Danken möchte ich auch allen labortechnischen Angestellten sowie Doktoranden-Kollegen der AG Worzfeld und Czubyko, die mir bei technischen sowie inhaltlichen Fragen immer behilflich waren; ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Chen Jiang.

Abschließend möchte ich meinem Doktorvater Prof. Thomas Worzfeld für die kontinuierliche Unterstützung sowie fördernden und motivierenden Worte während des praktischen Jahres danken.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

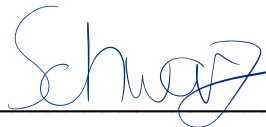
Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Intraperitoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms: Funktionelle Analyse der Tumor-Mesothel-Interaktion in einem neu etablierten dreidimensionalen Invasionsassay* im Institut für Pharmakologie unter Leitung von Prof. Thomas Worzfeld ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

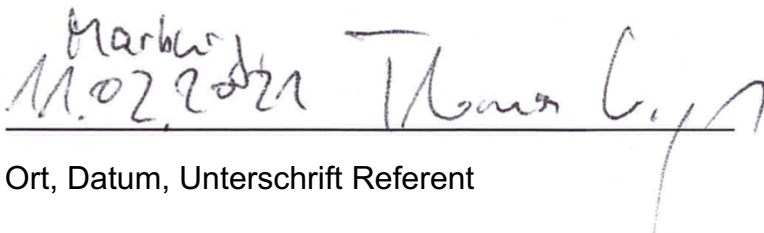
Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Münster, 13.02.2021



Ort, Datum, Unterschrift Doktorand



Ort, Datum, Unterschrift Referent